

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITA' DI BOLOGNA

CAMPUS DI CESENA

SCUOLA DI INGEGNERIA E ARCHITETTURA

CORSO DI LAUREA IN INGEGNERIA BIOMEDICA

SOSTITUENTI SANGUIGNI ARTIFICIALI

Elaborato in:

BIOCHIMICA

Relatore

Dott. Emanuele D. Giordano

Presentata da

Francesco Baldacci

Sessione I

Anno Accademico 2013/2014

Indice

Prefazione	5
------------------	---

CAPITOLO 1.

Sangue.....	7
1.1.1.Plasma.....	7
1.1.2.La componente corpuscolare.....	8
1.1.3.Produzione degli elementi corpuscolari.....	8
1.1.4.Emopoiesi.....	9
1.1.5.Fattori che operano il controllo dell'emopoiesi.....	9
1.1.6.I fattori stimolanti le colonie (CSF)	10
1.1.7.Eritropoietina.....	10
1.1.8.Globuli rossi	10
1.1.9.Anomalie dei globuli rossi.....	12
1.2.1.Piastrine.....	14
1.2.2.Emoglobina.....	15

CAPITOLO 2.

Sostituenti acellulari	19
2.1.1.Trasportatori basati sulla nanobiotechnologia.....	19
2.1.2.Poliemoglobina (PolyHb).....	19
2.1.3.Emoglobina coniugata.....	22
2.1.4.Emoglobina fibrinogeno.....	22
2.1.5.Crosslink intermolecolari di tetrameri di emoglobina.....	24
2.1.6.Emoglobina umana ricombinata.....	24
2.1.7.Unione di emoglobina con enzimi antiossidanti.....	26
2.1.8.Trasporto di CO ₂	31
2.1.9.Poliemoglobina SOD-CAT-CA.....	31
2.2.1.Emoglobina e altri enzimi.....	33
2.2.2.Confronto tra sangue di donatori e poliemoglobina.....	34

CAPITOLO 3.

Sviluppo di eritrociti artificiali.....	37
3.1.1.Principi di base	38
3.1.2.Stato presente delle cellule artificiali	39
3.1.3.Eritrociti artificiali di dimensione micrometrica con membrana sintetica ultrasottile	42
3.1.4.Membrane lipidiche di cellule artificiali inferiori al micron di diametro.....	46
3.1.5.Membrane polimeriche artificiali biodegradabili.....	49
3.1.6.Enzimi e multienzimi.....	51
3.1.7.Applicazioni.....	53
 Bibliografia	 61

Prefazione

Il presente elaborato ha lo scopo di esporre la ricerca condotta in campo dei sostituenti sanguigni artificiali.

Nel capitolo 1. viene presentata una panoramica sul tessuto sanguigno dove lo si distingue in due componenti principali, plasma e parte corpuscolata.

La componente corpuscolare più importante è il *globulo rosso*, grazie a questo corpuscolo è possibile il trasporto dell'ossigeno ai tessuti e dell'anidride carbonica ai polmoni.

Viene chiarito come avviene il trasporto di questi gas e introdotta l'*emoglobina*, illustrando poi come avvengono i legami con l'ossigeno e l'anidride carbonica, questa molecola risulta essere fondamentale per il suddetto trattato in quanto i sostituenti sanguigni si basano proprio su quest'ultima.

Il capitolo 2. introduce i sostituenti sanguigni artificiali e ne descrive la struttura e gli effetti sul nostro organismo confrontandoli con il sangue dei donatori.

Il capitolo 3. presenta gli eritrociti artificiali basati sull'utilizzo di membrane artificiali basate su lipidi e polimeri biodegradabili.

Capitolo 1

Sangue

Il sangue costituisce $\frac{1}{4}$ del liquido extracellulare, l'ambiente interno che bagna le cellule.

Un soggetto di circa 70 Kg possiede circa 5 litri di sangue, di questo volume, circa due litri sono costituiti da *elementi corpuscolari* mentre i restanti tre litri sono composti dal *plasma*.

Queste due componenti permettono il funzionamento del nostro organismo in quanto la parte “corpuscolata” trasporta l'ossigeno e, in minor misura l'anidride carbonica mentre la parte “liquida” permette l'osmoregolazione, trasporta i nutrienti e tutte le sostanze come ormoni, acqua, vitamine, enzimi, proteine e tanto altro necessari al funzionamento di tutte le cellule del nostro corpo [1].

1.1.1. Plasma

Il plasma è la parte liquida del sangue in cui sono sospesi gli elementi corpuscolari. L'acqua è la componente principale e corrisponde a circa il 92% del suo peso. Le proteine rappresentano un altro 7%; il restante 1% è costituito da altre molecole organiche disciolte (amminoacidi, glucosio, lipidi, prodotti di scarto), ioni (H^+ , HCO^{3-} , Na^+ , K^+ etc.), vitamine e oligoelementi ed infine ossigeno (O^2) e anidride carbonica (CO^2). La composizione del plasma è simile a quella dell'liquido interstiziale, con eccezione delle proteine plasmatiche. Le albumine sono il tipo prevalente. La presenza delle proteine nel plasma rende la pressione osmotica del sangue maggiore di quella del liquido interstiziale [1]. Le proteine plasmatiche partecipano a molte funzioni, tra cui la coagulazione e la difesa contro agenti patogeni esterni. Inoltre fungono da trasportatori per ormoni, colesterolo, farmaci e certi tipi di ioni come ad esempio il ferro (Fe^{2+}).

1.1.2. La componente corpuscolata

Nel sangue sono presenti 3 principali elementi corpuscolati: globuli rossi detti anche *eritrociti*, globuli bianchi detti anche *leucociti* e le piastrine o *trombociti*.

Solo i globuli bianchi sono cellule “complete”, perché i globuli rossi perdono il nucleo appena entrano nel circolo sanguigno, mentre le piastrine sono frammenti di una cellula chiamata megacariota [2].

Gli eritrociti svolgono un ruolo chiave nel trasporto dell'ossigeno dai polmoni ai tessuti e nel trasporto dell'anidride carbonica dai tessuti ai polmoni. Le piastrine sono essenziali per la coagulazione, processo per mezzo del quale il sangue si solidifica bloccando l'emorragia dei vasi danneggiati. I leucociti hanno un ruolo fondamentale nella risposta immunitaria dell'organismo, poiché lo difendono da agenti come parassiti, virus e batteri.

Il sangue contiene 5 tipi di globuli bianchi: linfociti, monociti, neutrofili, eosinofili e basofili.

I monociti che lasciano la circolazione sanguigna si convertono in macrofagi.

I basofili tissutali sono detti mastociti.

I leucociti possono essere divisi in tre gruppi in base a caratteristiche funzionali e morfologie comuni. I neutrofili, i monociti e i macrofagi sono denominati *fagociti*, ed hanno la capacità di inghiottire particelle estranee.

I linfociti sono detti *immunociti*, perché responsabili delle risposte immunitarie.

Basofili, eosinofili e neutrofili sono chiamati *granulociti*, contengono delle inclusioni citoplasmatiche che conferiscono loro un aspetto granulare [1].

1.1.3. Produzione degli elementi corpuscolati

Tutti gli elementi corpuscolati discendono da un unico tipo di cellula, definita *cellula staminale emopoietica pluripotente*.

Questa cellula è presente principalmente nel midollo osseo, un tessuto molle che riempie gli spazi all'interno delle ossa.

Le cellule pluripotenti hanno la capacità di differenziarsi in vari tipi di cellule, man mano che maturano esse riducono la loro capacità di differenziazione fino ad arrivare alle *cellule progenitrici*. Queste cellule si differenziano in globuli rossi, linfociti e altri tipi di globuli bianchi e in megacarioti [2].

1.1.4. Emopoiesi

Da definizione è la formazione degli elementi corpuscolati del sangue. Inizia precocemente durante lo sviluppo embrionale e continua per tutta la durata della vita.

Alla terza settimana dello sviluppo embrionale, specifiche cellule del sacco vitellino formano dei raggruppamenti.

Alcuni di questi sono destinati a diventare elementi corpuscolati del sangue. Nell'adulto solo la pelvi, parte della colonna vertebrale, costole, il cranio e le prossimità delle ossa lunghe sono in grado di formare corpuscoli sanguigni. Il midollo attivo è di colore rosso, per la presenza di emoglobina, che è la proteina legante ossigeno presente nei globuli rossi; il midollo inattivo è di colore giallo per l'abbondanza di adipociti (cellule del grasso). Nelle regioni emopoietiche del midollo osseo, circa il 25% delle cellule in maturazione genera globuli rossi, mentre il 75% è destinato alla formazione di globuli bianchi.

La durata di vita dei globuli bianchi è molto più corta rispetto a quella dei globuli rossi e quindi essi devono essere sostituiti più spesso.

I globuli rossi vivono per circa 4 mesi nel sistema circolatorio [2].

1.1.5. Fattori che operano il controllo dell'emopoiesi

L'emopoiesi è regolata da fattori noti come *citochine*: peptidi o proteine rilasciati da una cellula per influenzare la crescita o l'attività di un'altra cellula.

Alcune delle citochine più note sono i *fattori stimolanti le colonie*, molecole sintetizzate da cellule endoteliali e da globuli bianchi.

Altre sono rappresentate da interleuchine, le quali svolgono un ruolo importante anche nel sistema immunitario.

Un'ulteriore citochina emopoietica è l'*eritropoietina* che controlla la produzione di globuli rossi, essa è prodotta in caso di necessità e non è pre-immagazzinata in vescicole [2].

1.1.6. I fattori stimolanti le colonie (CSF)

Identificati e denominati in tale modo perché hanno la capacità di stimolare la crescita di colonie di globuli bianchi in coltura (leucopoiesi). Queste citochine prodotte dalle cellule endoteliali chiamate fibroblasti e dai globuli bianchi regolano la produzione e lo sviluppo dei leucociti. Un aspetto interessante è che una parte della leucopoiesi è governata dai globuli bianchi già esistenti, questa forma di autocontrollo fa sì che si sviluppino globuli bianchi molto specifici e che questo sviluppo si adatti alle necessarie esigenze del nostro organismo.

1.1.7. Eritropoietina (EPO)

L'eritropoiesi, produzione di eritrociti, è regolata dalla glicoproteina eritropoietina (EPO). Essa è principalmente sintetizzata dal rene negli organismi adulti; lo stimolo per il rilascio di EPO è l'ipossia, ossia la presenza di bassi livelli di ossigeno nei tessuti. Questa regolazione ha lo scopo di mantenere l'omeostasi: l'EPO stimolando la sintesi di globuli rossi determina l'immissione di una maggiore quantità di emoglobina in circolo per il trasporto di ossigeno [2].

1.1.8. Globuli rossi

Sono gli elementi corpuscolati più abbondanti nel sangue; la loro funzione principale è quella di trasportare ossigeno dai polmoni alle cellule e l'anidride carbonica dalle cellule ai polmoni.

Il rapporto tra plasma e globuli rossi viene indicato con il nome di *ematocrito* e viene espresso in percentuale sul volume del sangue totale. Come detto precedentemente essi vengono prodotti dal midollo osseo, man mano che le cellule staminali si differenziano il nucleo si condensa e il loro diametro diminuisce da 20 micrometri a 7 micrometri. Prima della maturazione definitiva il nucleo viene espulso e fagocitato dai macrofagi del midollo osseo; nello stesso momento gli organelli come i mitocondri vengono incontro a lisi e scompaiono.



Figura 1.1. Vista dei globuli rossi attraverso microscopio.
Si noti la caratteristica forma a disco biconcavo [3] .

L'ultima forma di cellula immatura, *il reticolocita*, lascia il midollo osseo e entra in circolo dove si trasforma nel giro di 24 ore in eritrocita maturo. I globuli rossi maturi hanno la forma di *disco biconcavo*, con il centro schiacciato e risultano essere un semplice contenitore membranoso ripieno di enzimi ed emoglobina; poiché non dispongono di mitocondri non possono attuare il metabolismo aerobico e quindi la loro fonte principale di ATP è la glicolisi.

Per la mancanza di nucleo non sono in grado di rinnovare gli enzimi e i componenti della membrana, questo fatto rende i globuli rossi soggetti a invecchiamento e perdita di flessibilità della membrana che li porta fino a rottura, quindi la loro vita media risulta essere circa di 120 giorni, la rottura avviene nel tentativo di passare in punti stretti oppure vengono catturati dai macrofagi mentre attraversano la milza.

La loro flessibilità permette di farli passare anche in luoghi molto stretti come i capillari; inoltre la forma a disco permette anche di adattarsi ai cambiamenti osmotici del sangue dove, se essi si trovano in un mezzo leggermente ipotonico si gonfiano, mentre se sono in un mezzo lievemente ipertonico si raggrinziscono.

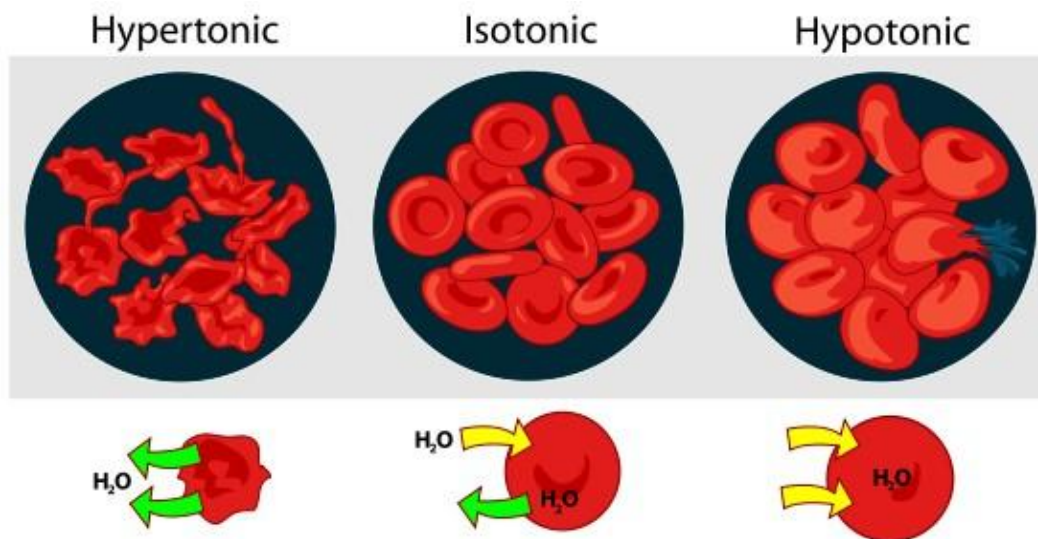


Figura 1.2. A sinistra abbiamo globuli rossi immersi in una soluzione ipertonica dove viene raffigurata la perdita di acqua da parte della cellula; al centro soluzione isotonica con la conseguenza di equilibrio e nessun cambio di forma da parte della cellula; infine a sinistra eritrociti in soluzione ipotonica con rigonfiamento fino a esplosione [4].

Grazie alla loro morfologia si possono individuare varie patologie la più conosciuta è l'anemia falciforme, gli eritrociti invece di avere una forma a disco biconcavo hanno una morfologia a falce e questo provoca una diminuzione del trasporto di ossigeno.

Interessante è anche il riciclo del contenuto dei globuli rossi, dove parte degli amminoacidi delle catene della globina vengono riciclati per sintetizzare nuove proteine, mentre alcuni atomi di ferro dei gruppi eme vengono utilizzati per formare nuovi gruppi eme. La parte restante dei vecchi gruppi eme viene convertita dalla milza in un liquido colorato chiamato bilirubina, che viene trasportata nel fegato, metabolizzata e incorporata nella bile [1,2].

1.1.9. Anomalie dei globuli rossi

È importante soffermarsi un attimo su quanto detto poco prima riguardo le anomalie della forma degli eritrociti e anche al loro numero nel sangue perché queste possono ridurre il trasporto di ossigeno.

Se il contenuto di emoglobina è troppo basso, una condizione nota come *anemia*, il sangue non riesce a trasportare abbastanza ossigeno per i tessuti, provocando stanchezza e debolezza.

Nelle anemie emolitiche il nostro corpo produce globuli rossi più fragili e quindi la loro rottura è molto più veloce; altre forme di anemia sono dovute ad un'anomala produzione di emoglobina, come nell'anemia falciforme, dove viene a formarsi una emoglobina anomala dovuto a un difetto

genetico che porta l'emoglobina a cristallizzare quando rilascia ossigeno e fa assumere una forma falciforme ai globuli rossi.

Essi si aggregano tra di loro quando passano in luoghi stretti impedendo il flusso di sangue ai tessuti e provocando ipossia.

Altre forme di anemia derivano da una insufficiente capacità del midollo osseo di sintetizzare abbastanza emoglobina, come nell'anemia sideropenica.

Se viene escreto più ferro di quanto ne viene introdotto con la dieta, il midollo osseo non dispone della quantità adeguata di ferro per sintetizzare i gruppi eme e la sintesi dell'emoglobina rallenta.

Risulta pericoloso avere una quantità troppo alta di globuli rossi, *policitemia vera*, questo porta ad avere un ematocrito troppo alto e quindi il sangue più denso con la conseguenza che esso ha più difficoltà a circolare causa attrito contro le pareti dei vasi [1].

Parte di questi concetti sono alla base di questo elaborato per lo studio di meccanismi che possono in parte aiutare il trasporto di ossigeno in casi di emergenza, fino ad arrivare al vero e proprio utilizzo di tecniche per sintetizzare in laboratorio cellule artificiali in grado non solo di svolgere questa funzione ma tante altre.

È utile introdurre qui di seguito il concetto di antigene per esporre in modo più completo il problema delle trasfusioni sanguigne.

Può essere definito *antigene* una qualunque sostanza estranea, che introdotta nel nostro organismo ha la capacità di provocare la formazione di anticorpi e di reagire in modo specifico con essi inducendo una reazione immunitaria.

Gli antigeni in genere sono molecole complesse, spesso proteine o polisaccaridi.

La specifica immunologica di un antigene non dipende dalla sua intera struttura, ma dipende da quella di un determinato sito della superficie, chiamato *determinante antigenico*.

Le proprietà antigeniche di una molecola dipendono dalla distribuzione spaziale sulla superficie di determinati gruppi chimici, i quali devono risultare estranei ai linfociti B: ciascun pattern molecolare riconoscibile non proprio costituisce un determinante antigenico.

La maggior parte degli antigeni possiede diversi determinanti antigenici, che costituiscono una sorta di "reparto", dove ogni uno dei quali stimola la proliferazione di determinati linfociti e quindi la produzione di specifici anticorpi.

La risposta immunitaria a un antigene è la somma delle risposte dei linfociti ai diversi determinanti antigenici presenti in esso.

Nell'uomo possono comportarsi come antigeni le molecole proteiche contenute nelle membrane dei globuli rossi.

Questi ultimi sono gli antigeni che caratterizzano i vari gruppi sanguigni e il sistema di istocompatibilità, importanti per trasfusioni e trapianti [1,5].

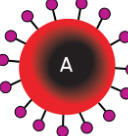
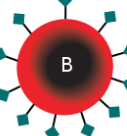
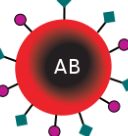
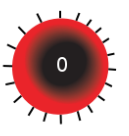


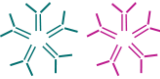



	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo AB	Gruppo 0
Tipi di GLOBULI ROSSI				
Anticorpi presenti	 Anti-B	 Anti-A	Nessuno	 Anti-A e Anti-B
Antigeni presenti	 A	 B	 A e B	Nessuno

Figura 1.3. Tabella contenente gli antigeni per ogni gruppo sanguigno e i relativi anticorpi che provocano il rigetto durante una trasfusione [6].

1.2.1. Piastrine

Sono frammenti cellulari prodotti nel midollo osseo dalle cellule dette megacariociti.

Queste cellule si sviluppano fino a raggiungere dimensioni molto grandi perché vanno in contro a molte mitosi senza subire divisione citoplasmatica e nucleare. La mitosi è un processo di riproduzione cellulare dove da una cellula “madre” si generano due cellule “figlie” aventi lo stesso numero di cromosomi della “madre”.

I bordi esterni dei megacariociti si estendono fino al lume dei seni ematici del midollo osseo, dove le estensioni citoplasmatiche si frammentano in piastrine.

I trombociti sono più piccoli dei globuli rossi, privi di colore e non sono dotati di nucleo.

La vita media delle piastrine si aggira intorno ad una decina di giorni, esse sono sempre presenti in circolo ma non si attivano fino a che non vi è una lesione della parete di un vaso sanguigno [2].

1.2.2. Emoglobina (Hb)

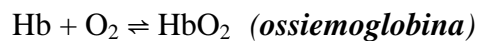
È una grande proteina complessa, la cui struttura quaternaria è caratterizzata da quattro catene proteiche globulari, globine, ogni una avvolta da un gruppo eme contenente ferro.

I quattro gruppi eme presenti in una molecola di emoglobina sono identici, ciascuno consiste di un anello porfirico costituito da carbonio, idrogeno e azoto con al centro un atomo di ferro (Fe).

Ciascun atomo di ferro presente nella molecola di emoglobina può legarsi con una molecola di ossigeno in modo reversibile.

La maggior parte dell'ossigeno viene trasportato dall'emoglobina, perché esso è molto poco solubile nel plasma.

Il legame con l'ossigeno segue la legge dell'azione di massa:



cioè se la concentrazione di ossigeno nel sangue aumenta allora la reazione di legame tra ossigeno ed emoglobina si sposta verso destra e aumenta la quantità di ossigeno legato all'emoglobina. Se la concentrazione diminuisce, la reazione si sposta verso sinistra e l'emoglobina rilascia parte dell'ossigeno legato.

A causa di questa legge l'ossigeno legato dipende dalla sua pressione parziale nel plasma (Po_2) che circonda i globuli rossi, maggiore è tale pressione più ossigeno viene legato e viceversa.

A livello dei polmoni viene legato la maggior quantità di ossigeno permessa dalla Po_2 del plasma e dal numero dei globuli rossi.

Quando il sangue arterioso raggiunge i tessuti, il processo di scambio si inverte e l'ossigeno disciolto diffonde attraverso i capillari sistemici nelle cellule e la risultante riduzione di Po_2 plasmatica altera l'equilibrio della reazione di legame rilasciando ossigeno.

La CO_2 è il prodotto di scarto della respirazione ed è molto più solubile dell'ossigeno nei liquidi corporei, però solo il 7% è trasportata dal sangue venoso, il restante 93% diffonde nei globuli rossi, dove il 70% viene convertito in ione carbonato e il 23% si lega all'emoglobina (Hb-CO_2).

La rimozione della CO_2 è molto importante perché una elevata Pco_2 provoca un disturbo del pH chiamato acidosi; valori estremi di pH possono denaturare le proteine mentre livelli troppo alti di Pco_2 deprimono le attività del sistema nervoso e possono causare morte [2].

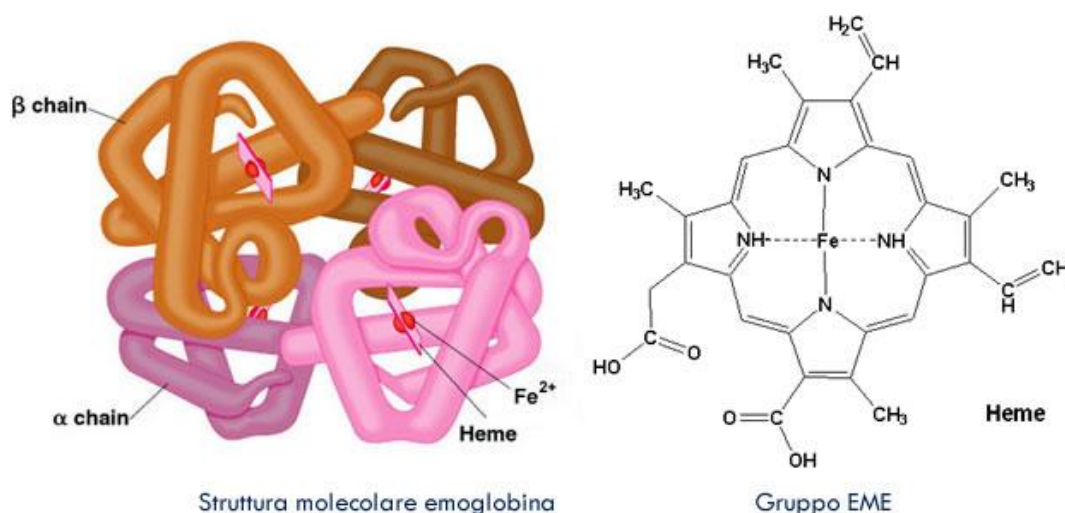


Figura 1.4. A sinistra struttura molecolare dell'emoglobina e a destra struttura chimica del gruppo eme contenuto all'interno della molecola [7].

CO₂ e lo ione bicarbonato: le molecole di CO₂ che entrano nel sangue vengono trasportate sotto forma di ione bicarbonato (HCO₃⁻) disciolto nel plasma.

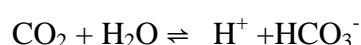
Questa conversione è utile in quanto costituisce un meccanismo per il trasporto di CO₂ dalle cellule ai polmoni e rende disponibile il bicarbonato come tampone per gli acidi metabolici contribuendo alla stabilità del pH sanguigno.

La rapida conversione dipende da un enzima chiamato *anidrasi carbonica* (AC) che si trova all'interno dei globuli rossi;

la CO₂ disciolta nel plasma diffonde nei globuli rossi, dove reagisce con l'acqua in presenza dell'AC formando l'acido carbonico (H₂CO₃) questo successivamente si dissocia in ione idrogeno e ione bicarbonato come da seguente formula:



a causa della rapida dissociazione il passaggio dall'acido carbonico si può tralasciare e si trasforma in questo modo:



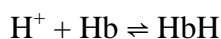
questa reazione è reversibile e la conversione della CO₂ in ione idrogeno H⁺ e ione bicarbonato HCO₃⁻ continua fino al raggiungimento dell'equilibrio.

Per mantenere tale equilibrio i prodotti devono essere rimossi dal citoplasma dei globuli rossi e se le loro concentrazioni sono tenute basse la reazione non raggiunge l'equilibrio permettendo una maggiore diffusione di CO₂ dal plasma ai globuli rossi [2].

Due meccanismi separati rimuovono H⁺ e HCO₃⁻:

nel primo HCO₃⁻ lascia il globulo rosso tramite una proteina di anticorpo. Questo processo viene chiamato *scambio di cloruri*, scambia uno ione HCO₃⁻ con uno ione Cl⁻ grazie a questo la neutralità della cellula è mantenuta inoltre il trasporto di HCO₃⁻ nel plasma assolve alla funzione di tampone citata precedentemente mantenendo un pH costante.

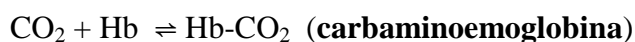
Il secondo meccanismo rimuove ioni H⁺ dal citoplasma dei globuli rossi. L'emoglobina all'interno agisce come tampone attraverso questa reazione:



questo meccanismo è importante perché previene grossi sbalzi di pH.

Se la Pco₂ sale molto sopra i valori limiti l'emoglobina non riesce più a tamponare gli ioni H⁺ provocandone un accumulo nel plasma e facendo diminuire il pH.

Il 23% della CO₂ si lega direttamente all'emoglobina; a livello delle cellule quando l'ossigeno si stacca dai siti di legame nella molecola di emoglobina, la CO₂ si lega secondo questa reazione:



Questa reazione è facilitata dalla presenza degli ioni H⁺ e della CO₂ perché entrambi riducono l'affinità dell'emoglobina a legare ossigeno [2].

Capitolo 2

Sostituenti acellulari

2.1.1. Trasportatori molecolari di ossigeno

Sostituenti contenenti solo emoglobina possono essere infusi subito dopo la perdita di grande volume sanguigno ripristinando così il livello di ossigeno nei tessuti [13].

È necessario modificare l'emoglobina perché quando essa viene estratta dai globuli rossi diventa estremamente tossica per i nostri reni.

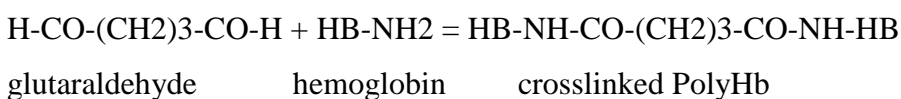
Quando viene infusa nel nostro corpo il tetramero di emoglobina ($\alpha_1\beta_1\alpha_2\beta_2$) si scinde in un dimero che risulta essere tossico ($\alpha_1\beta_1$ e $\alpha_2\beta_2$).

L'obiettivo è quello di fare un uso eccellente delle proprietà di trasporto dell'emoglobina ma nello stesso tempo di renderla non tossica per il nostro organismo.

Sono stati sviluppati diversi tipi di emoglobina modificata ma solo 4 tipi sono stati testati in usi clinici, si tratta di: poliemoglobina, emoglobina coniugata, tetrameri di emoglobina uniti attraverso crosslink e emoglobina umana ricombinata [8].

2.1.2. Poliemoglobina (PolyHb)

La poliemoglobina viene ottenuta utilizzando un agente chimico denominato *glutaraldeide* per effettuare il crosslink di più molecole di emoglobina, cioè una modifica reticolare che consente la formazione di legami chimici tra catene di molecole polimeriche, ottenendo un aumento della massa molecolare [9, 13]. Questa sostanza non è altro che un agente bifunzionale in grado di reagire con i gruppi amminici delle molecole di emoglobina permettendo l'unione intermolecolare di esse, ottenendo così dei polimeri solubili.



Viene riportato di seguito una semplificazione del processo che porta alla formazione di questa molecola in laboratorio.

In particolare questo processo ci permette di ottenere delle molecole di poliemoglobina aventi un basso contenuto di tetrameri di emoglobina (0.2 fino a 2%) che renderebbero la nostra molecola impossibilitata al trasporto di ossigeno se in quantità superiore.

Crosslinking: la reazione di crosslink viene effettuata in una camera raffreddata alla temperatura di 4 °C [13].

Come prima cosa si versano 117 ml di emoglobina con un concentrazione di 8.55 g/dl in una beuta di 500 ml. Si aggiungono 40 ml 0.2 M di fosfato di sodio per tamponare la soluzione fino ad ottenere un pH di 7.4 e 4 ml a 4 M di NaCl; a questo punto si prepara una soluzione denominata lisina monoidrocloride ottenuta unendo 11.87 g di prodotto biochimico (SIGMA o FISHER) + 50 ml a 50 mM di fosfato di sodio come tampone per raggiungere lo stesso pH della soluzione di emoglobina; questa soluzione è conservata ad una temperatura di -20 °C e ricongelata immediatamente dopo il suo utilizzo.

Si aggiunge alla soluzione di emoglobina 1.33 ml a 1.3 M di lisina monoidrocloride in 0.1 M di fosfato tampone, ottenendo così un rapporto molare di 11.1:1 ; infine si riempie la beuta con azoto allo stato gassoso e si sigilla il contenuto mettendola in un mescolatore a 140 rpm a 4 °C per 1 h.

Senza fermare il mescolatore, aggiungere lentamente 5 ml a 0.5 M di glutaraldeide, riempire nuovamente la beuta con azoto e sigillarla continuando il mescolamento per 24 h a 4 °C.

Senza fermare il mescolatore, aggiungere 31.6 g di lisina secca per fermare la reazione (fino ad ottenere un rapporto M:M di 1118:1), riempire la beuta con azoto e sigillarla continuando il mescolamento a 150 rpm a 4 °C per 1 h.

In fine centrifugare la soluzione a 8000 rpm a 4 °C per 60 minuti.

Attraverso questo procedimento effettuato in laboratorio si può ottenere una molecola di PolyHb la cui struttura è rappresentata nella figura sottostante [8].

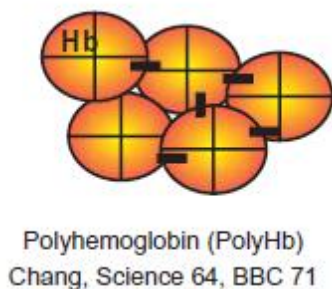


Figura 2.2.4. Struttura molecolare dell'emoglobina PolyHb [10].

La poliemoglobina è stata sviluppata per uso clinico come segue.

Una prima forma è ottenuta dall'emoglobina umana; i test clinici hanno mostrato che essa può essere utilizzata come sostituto del sangue perso a seguito di un incidente il quale provoca una diminuzione di emoglobina fino ad un livello mortale, oppure può essere infusa in caso di shock emorragico senza perdere tempo. Un'altra risorsa di emoglobina deriva dai bovini, suini e quella derivante dal sangue della placenta umana; in particolare la poliemoglobina derivata dai bovini è stata sperimentata con ottimi risultati e è stata approvata per l'utilizzo sia in Russia che in Sud africa.

A differenza delle cellule sanguigne biologiche queste sono prive di gruppo sanguigno, prive da ogni malattia infettiva (HIV, epatite e altri batteri) e cosa molto importante possono essere conservate in una stanza a temperatura ambiente per più di un anno, a differenza del sangue derivante da un donatore il quale deve essere conservato a 4°C e al massimo per un tempo di 42 giorni [8].

Grazie alle loro dimensioni ridotte esse sono utilizzate anche in caso di attacco di cuore o ad una ostruzione dei vasi sanguigni questo perché le cellule biologiche di dimensione pari a 7 micron non riuscirebbero a oltrepassare l'ostacolo mentre le cellule artificiali passano tranquillamente oltre permettendo l'arrivo di ossigene nelle zone interdette da questa ostruzione.

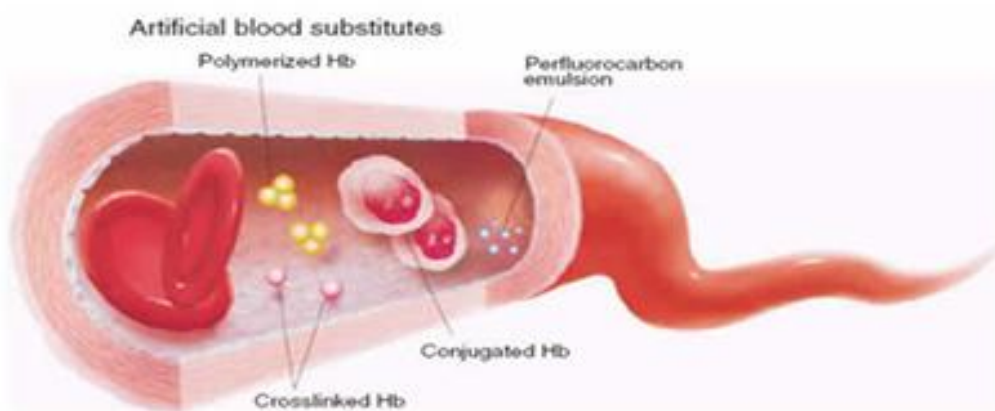


Figura 2.1.5. Raffigurazione di un vaso sanguigno contenente in circolo sostituenti sanguigni artificiali e globuli rossi per notare le differenze di dimensione e quindi i relativi vantaggi e svantaggi che possono apportare alla circolazione [12].

Questo tipo di emoglobina è adatta ad un utilizzo tempestivo perché essa crea dei radicali di ossigeno che provocano ischemia. Per evitare questa situazione all'interno dei globuli rossi sono presenti degli enzimi antiossidanti, purtroppo dovuta alla elevata quantità infusa di emoglobina essi non sono sufficienti per rimuovere questi radicali [11].

2.1.3. Emoglobina coniugata

In presenza di diamine e Hb, un agente chimico (sebacyl chloride) può effettuare il crosslink dell'emoglobina in un polimero insolubile chiamato emoglobina coniugata. Questo metodo è stato esteso da una procedura che permette la realizzazione emoglobina coniugata solubile (intramolecolare) formata attraverso l'unione di 1 molecola di Hb con un polimero solubile (PEG o Dextran) [8, 13].

Inoltre questa tipologia di molecola è stata ingegnerizzata attraverso l'utilizzo di meleimide-polyethylene glycol ottenendo una molecola che non causa aumento di pressione nei vasi sanguigni. Sono in corso dei test in fase II con due tipologie di PEG-Hb che promettono risultati in ambito di terapie antitumorali.

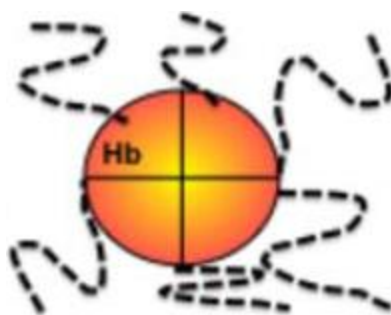


Figura 2.1.6. Struttura molecolare dell'emoglobina coniugata [10].

2.1.4. Emoglobina-fibrinogeno

In caso di un grande volume di sangue perso la poliemoglobina può ripristinare i livelli di emoglobina nel sangue ma anche le piastrine e i fattori anticoagulanti devono essere reintrodotti.

Studiando su cavie di laboratorio si è scoperto che rimpiazzando più del 80% del volume totale sanguigno si andava in contro a possibili trombi [11].

Per contrastare questo si è unito all'emoglobina il fibrinogeno formando la PolyHb-Fg.

Utilizzando questa nuova molecola si può rimpiazzare tranquillamente fino al 98% di volume sanguigno senza andare in contro a problemi di trombo.

Essa è preparata come segue. Una soluzione contenente fibrinogeno di 40 mg viene fatta dissolvere in 4 ml di lattato di Ringer, una soluzione isotonica, 4 ore prima che avvenga la polimerizzazione. Passate 24 h la polimerizzazione viene stoppata tramite un raffreddamento con 2.0 M di lisina ottenendo un rapporto di 200:1 lisina e Hb [8].

Sperimentazione in vitro:

viene preparata una beuta di vetro con 250 µl di sostituito sanguigno; si aggiungono 250 µl di sangue fresco e viene fatto partire il tempo in modo tale da poter quantificare in qualche modo l'effetto di questa nuova molecola sul sangue. Con l'utilizzo della PolyHb i coaguli che si formano non aderiscono alla parete vetrosa della beuta e non può essere conteggiato un tempo di coagulo. Con l'utilizzo della PolyHb-Fb i coaguli che si vanno a formare si attaccano alla parete vetrosa e può essere quantificato un tempo di coagulo [8].

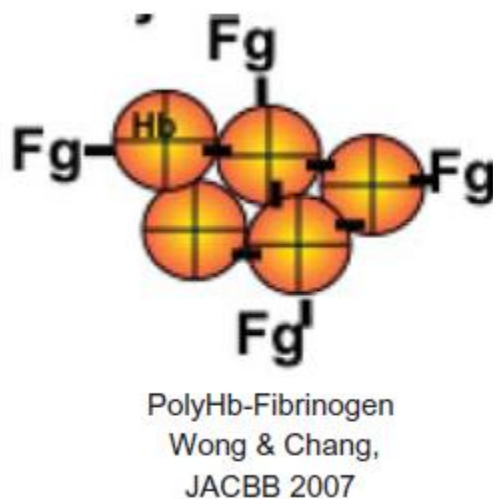


Figura 2.1.7. Struttura molecolare PolyHb-fibrinogeno [10].

2.1.5. Crosslink intermolecolari di tetrameri di emoglobina

Attraverso l'uso di 2,3-DPG, 3,5-dibromosalicyl fumerate viene effettuato il crosslink delle due α subunità delle molecole di emoglobina. Questo procedimento previene la comparsa di dimeri tossici.

In fase di test ha dimostrato di creare problemi di vasopressione e lesioni cardiache e quindi è stata abbandonata per seguire altre strade [8].

2.1.6. Emoglobina umana ricombinata

Viene prodotta mediante ingegnerizzazione del batterio E.coli. Questa forma è ottenuta dall'unione di due alfa unità di differenti molecole di emoglobina per prevenire la rottura in 2 metà molecole chiamate dimeri.

Durante i test sono stati verificati effetti di vasopressione dovuti alla cattura di ossido nitrico (NO) poi rimossi grazie all'introduzione di una nuova tipologia in grado di non catturare NO, il quale è necessario per avere una dilatazione ottimale dei nostri vasi sanguigni [8].

Type	Method of Preparation	Notes
PolyHb based on nanobiotechnology	Glutaraldehyde is the bifunctional agent being used to crosslink Hb intermolecularly to form soluble PolyHb polymers, each averaging 3–10 Hb molecules.	These PolyHbs with unpolymerized Hb removed do not cross the intercellular junction of the endothelial cell lining of blood vessels to remove nitric oxide; as a result, they do not have adverse vasopressor effects. Two types of PolyHb are in the final stages of phase III clinical trials and one of these is approved for human use in South Africa.
Conjugated Hb	PEG molecules are linked to each Hb molecule. The PEG and the water of hydration both contribute to a larger diameter PEG-Hb molecule.	If each of the PEG-Hb molecules with its added water of hydration approaches the required dimension, then there is no vasopressor effect as long as there are no free single Hb molecules. PEG-Hb is being tested in ongoing phase II clinical trials.
Crosslinked molecular Hb	Each Hb molecule is intramolecularly crosslinked to prevent the Hb from breaking down into half molecules (dimers).	These molecular-dimension Hb molecules cross the intercellular junction of the endothelial cell lining of blood vessels and remove nitric oxide needed for normal vasoactivity.
Recombinant molecular Hb	Recombinant human Hb with fusion of the two α subunits of each Hb molecule to prevent its breakdown into half molecules (dimers).	Vasopressor effects observed in clinical trials for the same reason as above. A new recombinant human Hb has been prepared that does not bind nitric oxide, thus eliminating the problem of vasopressor effects. This new type has still the disadvantage of being removed faster from the circulation but it is a potential source of Hb for PolyHb and conjugated Hb, and other future-generation Hb-based blood substitutes.

Figura 2.1.8. La tabella contiene i metodi di preparazione per le varie tipologie di emoglobina [10].

Questa nuova forma di emoglobina umana ricombinata può essere utilizzata come una potenziale risorsa di Hb per la produzione di PolyHb e Hb coniugata e altri future generazioni di sostituenti acellulari.

2.1.7. Unione di emoglobina con enzimi antiossidanti

In una situazione di shock emorragico prolungato, infarto o ischemia vi è un insufficiente apporto di ossigeno ai tessuti. L'ischemia provoca la produzione di ipoxantina. In condizioni normali la xantina deidrogenasi riduce questa sostanza prodotta in acido urico. Durante una ischemia, questo enzima viene convertito in xantina ossidasi in proporzione alla durata della mancanza di ossigeno, quando viene reintrodotta l'ossigeno la xantina ossidasi converte l'ipoxantina in superossido. Attraverso dei meccanismi particolari il superossido è coinvolto nella formazione di radicali di ossigeno che possono causare seri problemi ai tessuti.

Studiando in modo più approfondito i meccanismi con i quali i globuli rossi riescono ad avere un potere antiossidante si è scoperto che questa funzione era catalizzata da due tipologie di enzimi: superossido dismutasi (SOD) e catalasi (CAT).

L'enzima SOD converte il superossido in perossido di idrogeno che a sua volta viene convertito in acqua e ossigeno dall'enzima CAT. In casi di ischemia prolungata gli enzimi normalmente contenuti all'interno dei globuli rossi non sono abbastanza per ovviare al problema dell'infortunio dovuto a ischemia-riperfusa.

Per contrastare questo problema viene preparata in laboratorio la molecola denominata PolyHb-SOD-CAT.

Viene ottenuta utilizzando glutaraldeide e stroma-free emoglobina (SFHb), questa emoglobina è ottenuta eliminando lo stroma delle membrane degli eritrociti ma risulta avere un livello di tossicità alto per i reni. La glutaraldeide permette il crosslink degli enzimi e dell'emoglobina per formare la molecola PolyHb-SOD-CAT, avente un livello di enzimi più alto rispetto ai globuli rossi.

In questa forma gli enzimi SOD e CAT rimangono uniti all'emoglobina e in circolo per circa 24 h, senza essere rimossi velocemente dalla circolazione come accade se essi si trovano liberi (circa 20-30 min) [8].

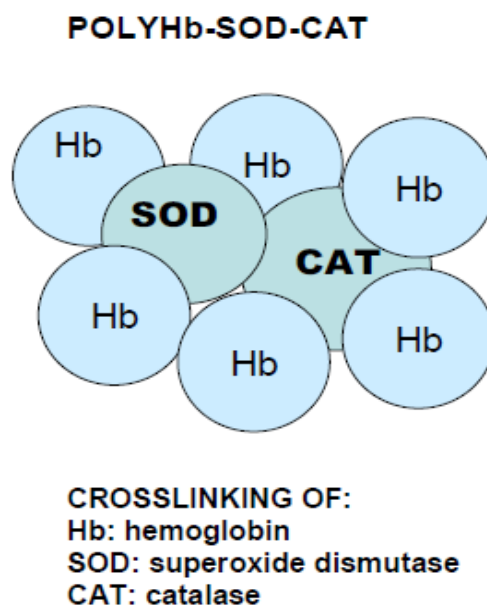
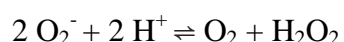


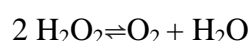
Figura 2.1.9. Raffigurazione struttura molecolare della PolyHb-SOD-CAT [13].

La dismutazione è un processo nel quale avvengono 2 reazioni opposte, una ossidazione e una riduzione, su due molecole uguali. L'enzima SOD prende due radicali superossido (ossigeno con un elettrone in più, O_2^-), strappa via l'elettrone in più dal primo e lo trasferisce al secondo.

In questo modo una delle due molecole si ritrova con un elettrone in meno e diventa ossigeno molecolare O_2 , l'altra avrà un elettrone in più e dopo essersi legata con due ioni idrogeno H^+ va a formare l'acqua ossigenata (H_2O_2) [14].



Poiché anche l' H_2O_2 è una molecola pericolosa per il nostro organismo, entra in gioco l'enzima CAT il quale decompone l' H_2O_2 in H_2O e O_2 secondo questa reazione:



quindi questa nuova tipologia di emoglobina ha la caratteristica di trasportare ossigeno ed è anche capace di rimuovere i radicali che si vengono a creare in presenza di ossigeno stabilizzando anche il crosslink ed evitando così l'ossidazione del ferro nei gruppi eme dell'emoglobina, risolvendo uno dei problemi della PolyHb.

Sono stati condotti test su cavie di laboratorio dove in esse veniva riprodotto un infarto o uno shock emorragico. Durante un infarto, che può essere procurato da varie cause tra le quali la principale risulta essere l'arteriosclerosi, si ha un restringimento dei vasi sanguigni con la conseguenza che gli eritrociti aventi una dimensione intorno ai 7 micron non sono in grado di avanzare per rifornire i tessuti con ossigeno. Quando i tessuti vengono nuovamente ossigenati attraverso una soluzione ricca di ossigeno (p.es utilizzo di PolyHb) si vengono a creare radicali di ossigeno che provocano ischemia-riperfusa fino ad arrivare alla morte cellulare. La PolyHb-SOD-CAT possiede la doppia funzione di trasportatore di ossigeno e rimozione dei radicali di ossigeno. Attraverso queste caratteristiche si può confrontare questa nuova molecola con la PolyHb utilizzando un modello che rappresenta una ischemia cerebrale avvenuta in un ratto. L'effetto della riperfusione è incominciato 1 h dopo l'ischemia e gli effetti sulla barriera sanguigna cerebrale e edema cerebrale sono stati seguiti nelle 6 h successive. L'utilizzo di PolyHb-SOD-CAT non ha riscontrato aumento di edema e l'abbassamento della barriera cerebrale risulta essere minimo [8]. Confrontando questi risultati con quelli riscontrati dopo l'utilizzo della PolyHb, la quale produce un aumento di edema cerebrale e un forte abbassamento della barriera sanguigna, si può concludere che la PolyHb-SOD-CAT può trasportare ossigeno al cervello senza andare ad aggravare le condizioni del modello [11, 15].

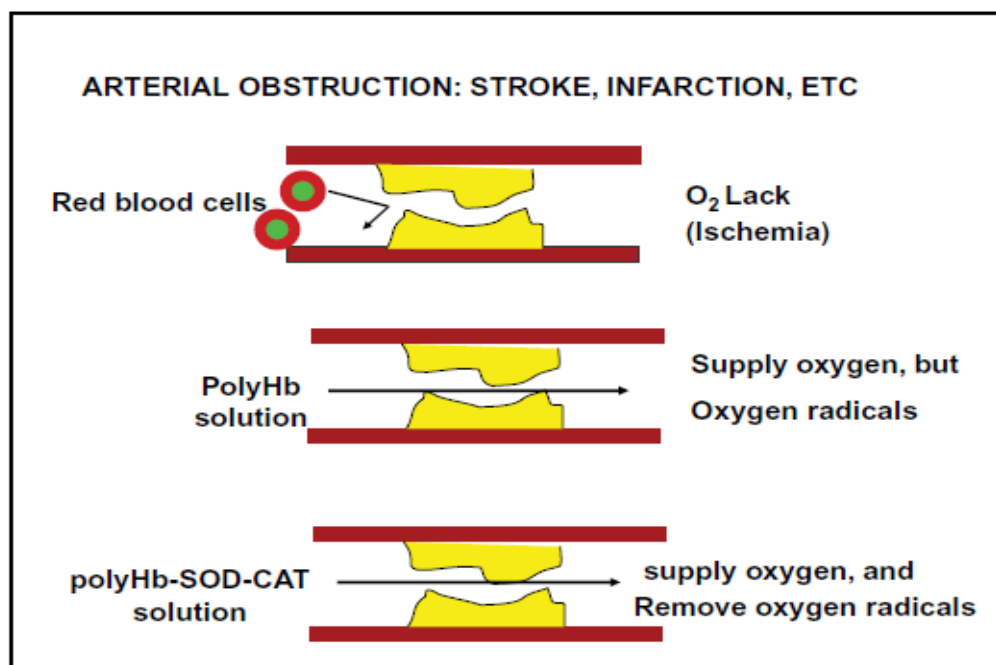


Figura 2.2.1. Ostruzione arteriosa dovuta a infarto o altro, si può notare come le cellule sanguigne non siano capaci di passare al di là dell'ostruzione mentre i sostituenti sanguigni possono passarvi facilmente attraverso [10].

Questa molecola viene ottenuta effettuando il crosslink di ogni grammo di Hb con 3000 U di SOD e 300 000 U di CAT. Il rapporto di emoglobina con gli enzimi SOD e CAT (mg/ml) è di 1 : 0.009 : 0.0045 ; avendo un rapporto così piccolo si hanno differenze minime in fatto di trasporto di ossigeno confrontandola con la PolyHb. Il rapporto degli enzimi si può modificare a seconda dell'utilizzo che ne deve essere fatto.

La miscela è preparata mescolando emoglobina (7 g/dl), SOD (1050 U/ml) e CAT (21 000 U/ml) in 50 mM di fosfato di sodio; il rapporto finale tra i componenti è di 1 g di Hb:15000 U SOD:300 000 U CAT [8].

Misura dell'attività dell'enzima SOD:

si fa riferimento all'analisi del citocroma c reduttasi. Una unità di SOD è definita come l'ammontare di enzimi che inibiscono il 50% dei citocromi c reduttasi sotto specifiche condizioni. La soluzione reagente consiste nel mescolare xantine (50 μ M), citocroma c (10 μ M) e l'enzima CAT (500 unità/ml) con 50 mM di fosforo di potassio utilizzato come tampone, 0.1 mM di EDTA con un pH di 7.8. L'enzima CAT è aggiunto per contrastare le interferenze che si possono creare tra Hb e il perossido di idrogeno. Viene analizzato poi un campione di questo preparato per determinare la percentuale di citocroma c attraverso una analisi con uno spettrofotometro a una grandezza di 550 nm [8].

Misura dell'attività dell'enzima CAT:

la sua attività viene stimata misurando la scomposizione del perossido di idrogeno a una dimensione di 240 nm. Lo spettrofotometro è sincronizzato attraverso l'utilizzo di 2 provette (1 ml) contenenti il campione da analizzare in 50 mM di fosfato di potassio come tampone per ottenere un Ph neutro. Durante il test al posto del tampone viene aggiunto perossido di idrogeno e ne viene valutata la assorbanza a 240 nm per 36 secondi. La percentuale di scomparsa del perossido è utilizzata per valutare l'attività dell'enzima CAT [8].

Percentuale di SOD/CAT e ossidazione di Hb:

il preparato è ottenuto aggiungendo 50 μ M di eme a 50mM di fosfato di potassio, pH 7.4 e una percentuale di enzimi SOD e CAT variabile (0, 1, 100), in fine si inseriscono enzimi attivatori in una quantità da 3 o 300 unità. Il campione da analizzare contiene xanthine (100 μ M) / xanthine ossidasi (10 mU/ml) oppure glucosio (10 mM) / glucosio ossidasi (10 μ g/ml). La reazione viene catalizzata con l'aggiunta di enzimi ossidanti alla temperatura di 23 °C e analizzata attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro. Lo spettro di assorbanza (500-700 nm) viene registrato a 1 scan/min per un totale di 25 minuti [8].

Preparazione del modello:

viene indotta una ischemia cerebrale attraverso l'occlusione delle arterie carotidi con un abbassamento della pressione sanguigna arteriosa (collasso delle arterie). Il modello preso in considerazione si tratta di un ratto maschio (235-255 g), anestetizzato e mantenuto alla temperatura di 38 °C durante l'esperimento. L'arteria femorale destra viene utilizzata per mantenere il controllo della pressione arteriosa. La vena femorale sinistra e l'arteria femorale sinistra sono cateterizzate in modo da effettuare iniezioni intravenose e causare ipotensione per far collassare le carotidi. Dopo questo procedimento vengono prelevati dall'arteria femorale sinistra 5 ml di sangue, in questo modo si induce una occlusione temporanea delle carotidi attraverso un abbassamento della pressione a 35 mmHg ; durante il periodo di occlusione la pressione viene mantenuta allo stesso livello attraverso prelievi o infusioni di sangue.

Studi condotti sulla barriera sanguigna cerebrale:

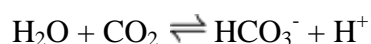
sono condotti effettuando una analisi della durata dell'ischemia utile per ottenere un effetto di ischemia-riperfusa. La durata degli studi è di : 0, 20, 30, 40 e 60 minuti. Questo è seguito da una riperfusione utilizzando 3 soluzioni: soluzione salina ossigenata, soluzione di PolyHb e soluzione di Hb; 1 h più tardi l'ischemia-riperfusa è misurata attraverso l'utilizzo di un liquido blu di Evans. Questo viene confrontato con una simulazione ottenuta in sala operatoria dove però non si era nella stessa situazione di tutte e due le carotidi occluse [8].

In base alle considerazioni e ai risultati ottenuti, si è scelto di utilizzare il modello descritto precedentemente per condurre gli studi anche su l'edema cerebrale. Dopo 1 h di ischemia le carotidi vengono ripristinate e viene rimpiazzato il sangue perso attraverso l'utilizzo di diverse soluzioni in una quantità di 0.8 ml/min : soluzione salina ossigenata, soluzione di Hb, soluzione di PolyHb, soluzione contenente un mix di Hb, SOD e CAT ed infine soluzione contenente PolyHb-SOD-CAT. Dopo periodi di tempi prestabiliti 1, 2, 4, 6 h si seguono le riperfusioni delle singole soluzioni, si sacrifica il modello per valutare le condizioni della barriera sanguigna cerebrale e dell'edema cerebrale; i risultati ottenuti vengono confrontati con la simulazione ottenuta in sala operatoria, dove bisogna sottolineare che non si era nelle stesse condizioni del nostro modello ma in quelle già citate qualche riga precedente [8].

2.1.8. Trasporto di CO₂

Fino ad ora abbiamo parlato solo del trasporto di ossigeno, però le cellule sanguigne trasportano anche la CO₂ fino ai polmoni per espellerla. Eseguendo dei test sulla pressione parziale della CO₂ (pCO₂) su cavie da laboratorio, in caso di grave emorragia, si è mostrato che la mortalità è correlata all'elevata pCO₂ dei tessuti.

Studiando le cellule sanguigne è apparso che l'enzima carbonato deidratasi (CA) contenuto nei globuli rossi, ha il compito di catalizzare la reazione tra CO₂ e H₂O in questo modo:



Quindi si è estesa la molecola precedente con un ulteriore enzima.

2.1.9. Poliemoglobina-SOD-CAT-CA

Partendo dalla molecola precedentemente introdotta, PolyHb-SOD-CAT che oltre ad essere trasportatrice di ossigeno possiede anche capacità antiossidanti, considerando che gli eritrociti hanno la capacità di trasportare CO₂ dai tessuti ai polmoni si introduce una nuova molecola chiamata PolyHb-SOD-CAT-CA. Misurando la pCO₂ dei tessuti di un modello soggetto a shock emorragico attraverso un microelettrodo, si può notare come essa sia collegata alla mortalità, in particolare alti livelli di pCO₂ nei tessuti provocano la morte del modello. Come descritto nel paragrafo 2.2.1. l'enzima CA è il mezzo di trasporto maggiore della CO₂ dei tessuti ai polmoni [15].

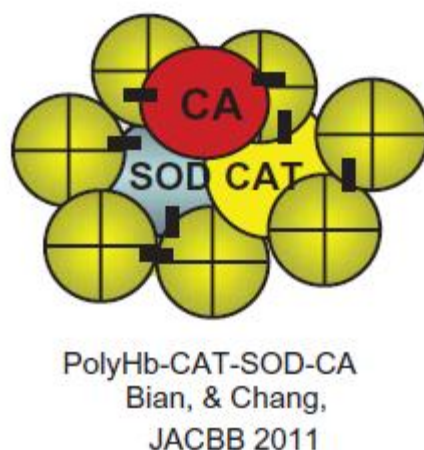


Figura 2.2.2. Struttura molecolare PolyHb-SOD-CAT-CA.

In questo modo si unisce la capacità di trasporto di ossigeno, il potere antiossidante e anche la capacità di trasportare l'anidride carbonica raggiungendo i tre obiettivi essenziali che riguardano la respirazione cellulare.

Studi su cavie di laboratorio hanno dimostrato che queste nuove molecole sono molto più efficaci di quelle biologiche nell'abbassamento dei livelli della $p\text{CO}_2$ nei tessuti come mostrato nel grafico sottostante.

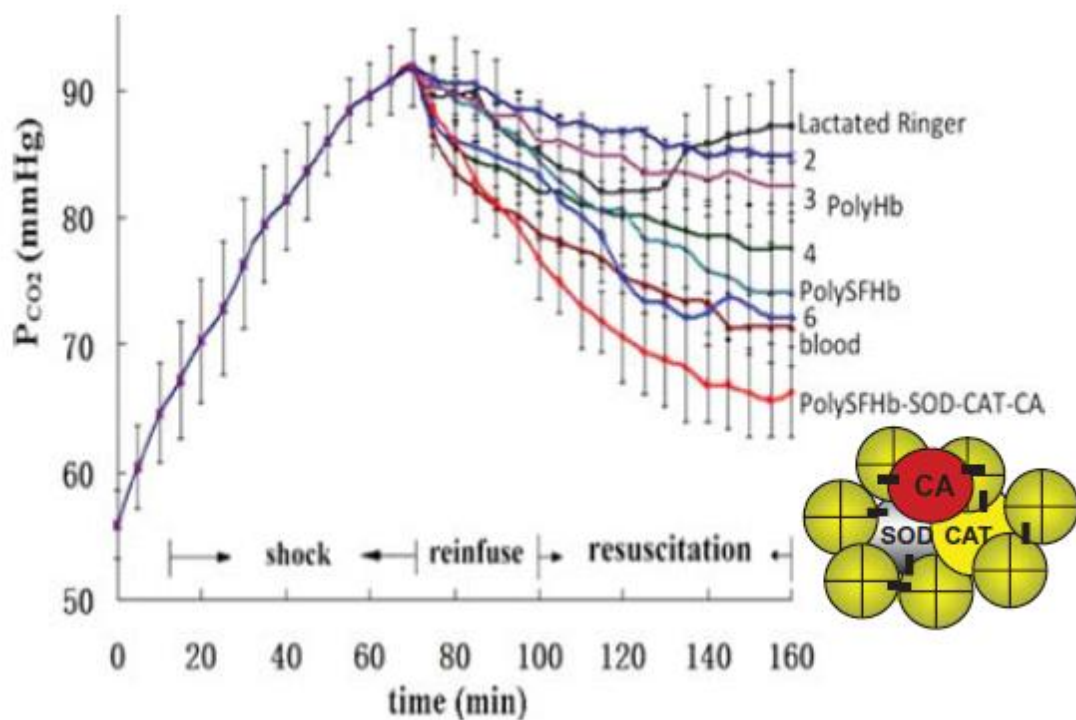


Figura 2.2.3. Shock emorragico in un ratto mantenendo la pressione arteriosa a 30 mmHg. La $p\text{CO}_2$ aumenta di continuo con il tempo. Operando una reinfusione con fluidi differenti come lattato di Ringer o PolyHb la $p\text{CO}_2$ dei tessuti non viene abbassata fino a superare il sangue o la PolyHb-SOD-CAT-CA dove quest'ultima porta la pressione di CO_2 a livelli minori rispetto al sangue.

2.2.1. Emoglobina con altri enzimi

L'obiettivo è quello di unire all'emoglobina enzimi che possono in qualche modo avere effetti positivi per il nostro organismo, non solo in presenza di emorragia ma anche in caso di altre patologie.

Una microcircolazione anomala dovuta ad un tumore provoca una diminuzione di irroramento di ossigeno in quell'area dalle cellule sanguigne.

Utilizzando la poliemoglobina si riesce a irrorare ossigeno anche in queste zone per fornire ossigeno utile per la chemioterapia.

Un altro esempio è stato ottenuto conducendo uno studio contro il melanoma, dove si è notato che unendo l'emoglobina con l'enzima tirosinasi, coinvolto nell'abbassamento di tirosina nel sangue, si ottiene la doppia funzione di trasporto di ossigeno e abbassamento del livello di tirosina diminuendo la crescita del melanoma [11].

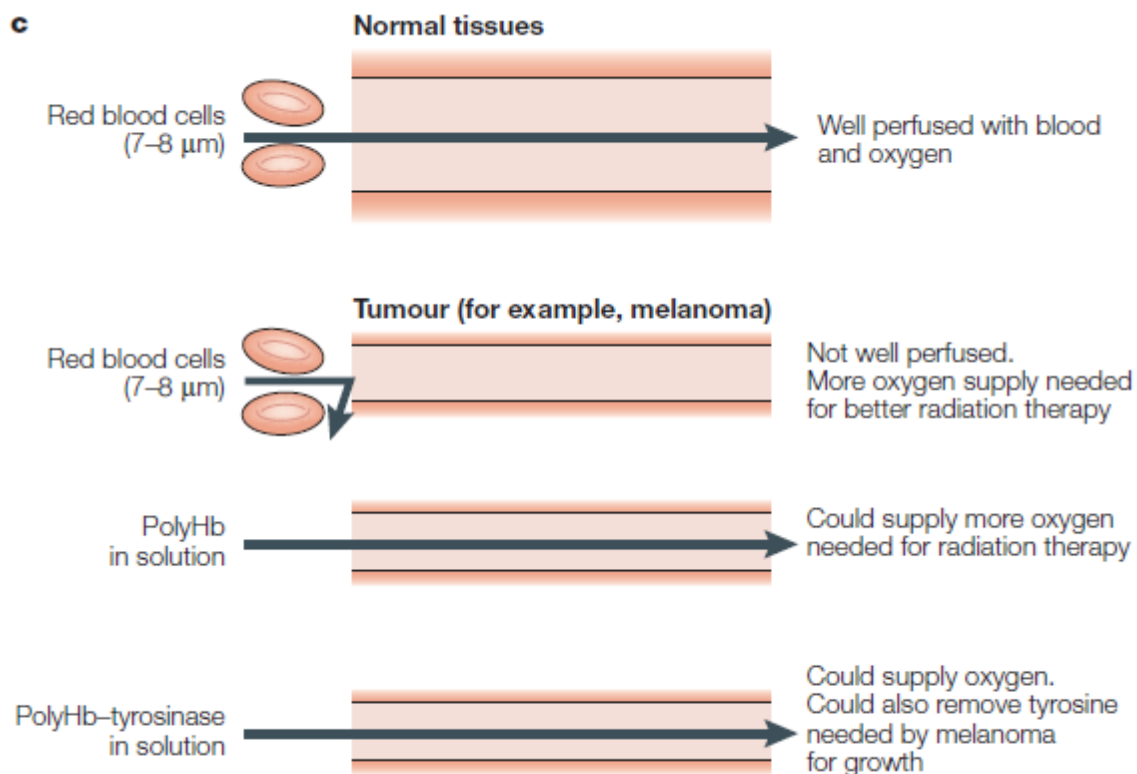


Figura 2.2.4. Nella prima immagine partendo dall'alto si può vedere il passaggio delle cellule sanguigne in un vaso senza nessun tipo di ostruzione. Seconda immagine abbiamo un vaso alterato a causa di un tumore, il quale provoca una diminuzione del diametro del vaso stesso e impedisce il passaggio delle cellule. La terza e la quarta immagine riportano come i sostituenti sanguigni siano molto più piccoli di diametro e quindi riescano a trasportare ossigeno dalla parte opposta all'ostruzione [16].

2.2.2. Confronto tra sangue di donatori e polyHb

Prima di tutto bisogna individuare gli aspetti chiave che riguardano le principali differenze.

Una prima distinzione la si può effettuare considerando gli *agenti infettivi*, per quanto riguarda il sangue derivante da donatori esso non è sterile al 100% ci sono particolari regioni dove malattie infettive, batteri e altro possono rendere il sangue non utilizzabile; la PolyHb invece risulta sterile in quanto preparata in laboratorio e prima di qualsiasi battere o agente infettivo, in oltre non possiede gruppo sanguigno.

Molto importante risulta anche la *disponibilità in natura*, il sangue umano è disponibile per un tempo limitato mentre l'utilizzo di PolyHb risulta essere illimitato perché in aggiunta all'emoglobina umana si può utilizzare quella bovina e quella ricombinata.

Il *tempo di circolazione e la funzione svolta* sono ulteriori elementi di confronto, le cellule sanguigne circolano 60 giorni e assolvono a moltissime funzioni mentre la PolyHb circola non più

di 12 ore, trasporta solo ossigeno ed anidride carbonica e può essere utilizzata solo per breve periodo di tempo e in modo tempestivo a seguito di un incidente [13].

	Human Donor Blood	Nanobiotechnology-based PolyHb
Infective agents	Rare in some regions using costly screening tests, but more frequent in other regions. If a new unknown infective agent appears, it might take years to develop a screening test for blood to be safe.	Infective agents can be sterilized and removed.
Source	Limited availability.	Unlimited because, in addition to human Hb (Hb), bovine Hb and recombinant human Hb can be used.
Blood group antigens	Blood group antigens need typing and crossmatching.	No blood group antigens.
Delay for use	Delay in use due to need for typing and crossmatching.	Can be used immediately because no typing or crossmatching is needed; being tested in ambulances in ongoing phase III clinical trials.
Storage stability	Can be stored for 42 days with standard refrigeration at 4°C.	Studies show that PolyHb can be stored for >1 year at room temperature.
Circulation time	About 60 days, depending on the length of storage.	Circulate effectively with a half-time of 24 h and are therefore good for short-term use, such as surgery and in emergencies. There are ways to increase its length of function, including: hemodilution, repeated infusion, and combination with erythropoietin.
Function	Complete RBC functions. In addition to carrying oxygen, RBC also have antioxidant enzymes and enzymes for preventing MetHb formation.	Function only as an oxygen carrier and are useful for several clinical uses. Other uses might require new generations of PolyHb (for example, PolyHb crosslinked to antioxidant enzymes). Future-generation nanodimension artificial RBC contain Hb and all of the enzyme systems of RBCs. Costs will increase with each new generation.
Vasopressor effect	No vasopressor effect.	To prevent vasopressor effect, single molecular-dimension Hb has to be eliminated.

Figura 2.2.5. Confronto tra sangue di donatore e Poly-Hb [10].

Capitolo 3

Cellule artificiali

Nel precedente capitolo si è visto come siano stati sviluppati sostituenti sanguigni acellulari in grado di trasportare ossigeno.

Ora bisogna chiedersi se sia possibile sviluppare una cellula complementamente artificiale che si avvicini il più possibile a una biologica e che possa essere utilizzata in ambito clinico.

In natura l'emoglobina è contenuta, insieme ad altre molecole con attività enzimatica, negli eritrociti. Il contenuto standard di queste cellule circolanti potrebbe essere inglobato all'interno di una membrana artificiale ultrasottile, per mantenere inalterate le funzioni delle molecole rilevanti. Nel processo di sviluppo di questi dispositivi sono state progressivamente realizzate cellule artificiali di dimensioni micrometriche, inferiori al micron e finalmente di dimensione nanometrica [17].

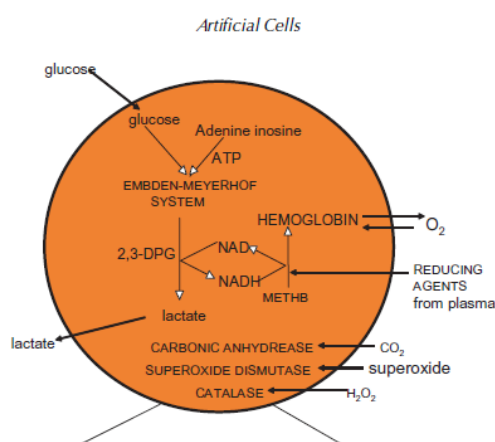


Figura 3.1. Cellula artificiale contenente vari tipi di meccanismi enzimatici [10].

3.1.1. Principi di base

L'inizio della ricerca in questo campo ha permesso di formare le basi per coinvolgere le cellule artificiali in moltissime aree di utilizzo.

Le cellule artificiali non sono considerate delle specifiche entità fisiche, l'idea è quella di utilizzarle per creare delle strutture artificiali, di dimensione cellulare, in grado di utilizzarle per rimpiazzare cellule che hanno perso determinate funzioni.

Chang, uno studente dell'università McGill, nel 1957 è stato in grado di ottenere per primo delle cellule artificiali sanguigne con membrana artificiale le quali non presentavano gruppo sanguigno, questa ricerca iniziale è il principio base sulla quale si è iniziato a svolgere ricerche in aree differenti, inclusa la nano medicina.

Le prime cellule artificiali posseggono alcune delle semplici proprietà delle cellule biologiche come la separazione dei contenuti cellulari dalla regione extracellulare; possono essere molto piccole e possedere una grande superficie, ad esempio 10 ml di cellule aventi diametro di 20 micrometri hanno una superficie totale di 2500 m^2 , queste microscopiche dimensioni consentono alle molecole di diffondere velocemente attraverso la membrana; infine le cellule artificiali possono contenere lo stesso materiale biologico delle cellule, e sono più versatili in quanto possono venire introdotte sostanze assorbenti o altre in grado di svolgere funzioni molto utili al nostro organismo [15, 17].

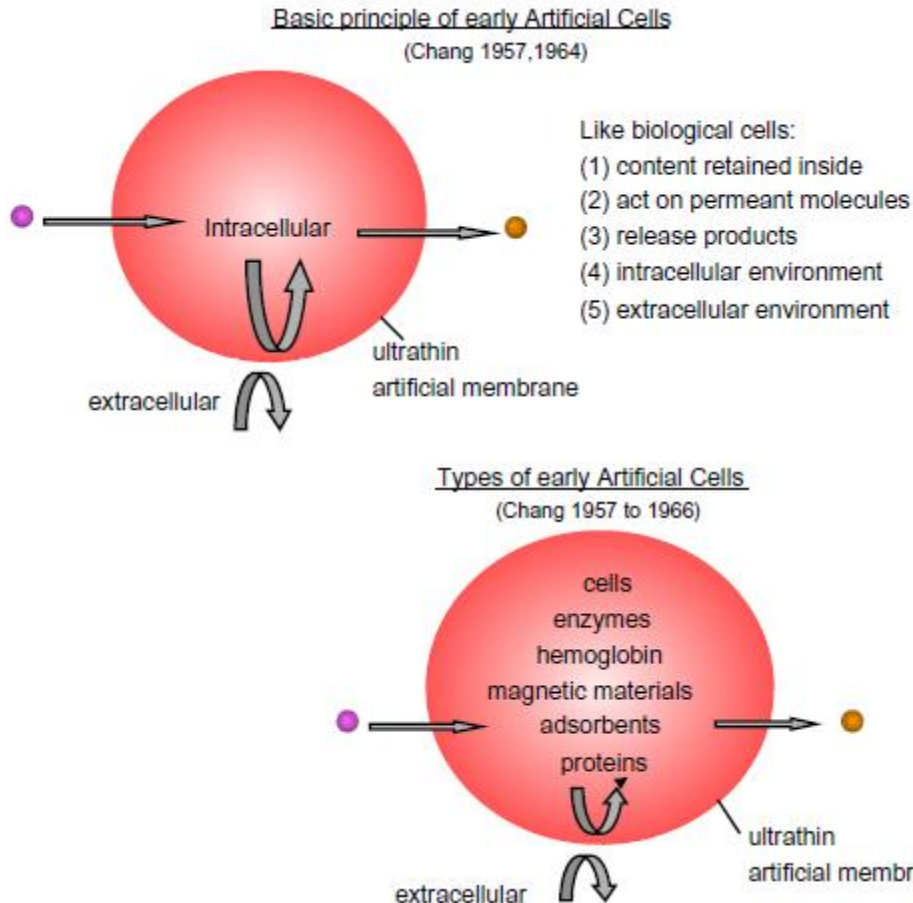


Figura 2.1.1. Principi di base della cellula artificiale, si può notare come l'ambiente intracellulare viene protetto da quello extracellulare e cosa può essere contenuto all'interno di essa [10].

3.1.2. Stato presente delle cellule artificiali di dimensione che varia dal micro a quella molecolare.

Le cellule artificiali possono essere utili per la realizzazione di un grande numero di sistemi ingegnerizzati attraverso il controllo delle loro specifiche (p.es. dimensione, contenuto, spessore delle membrane).

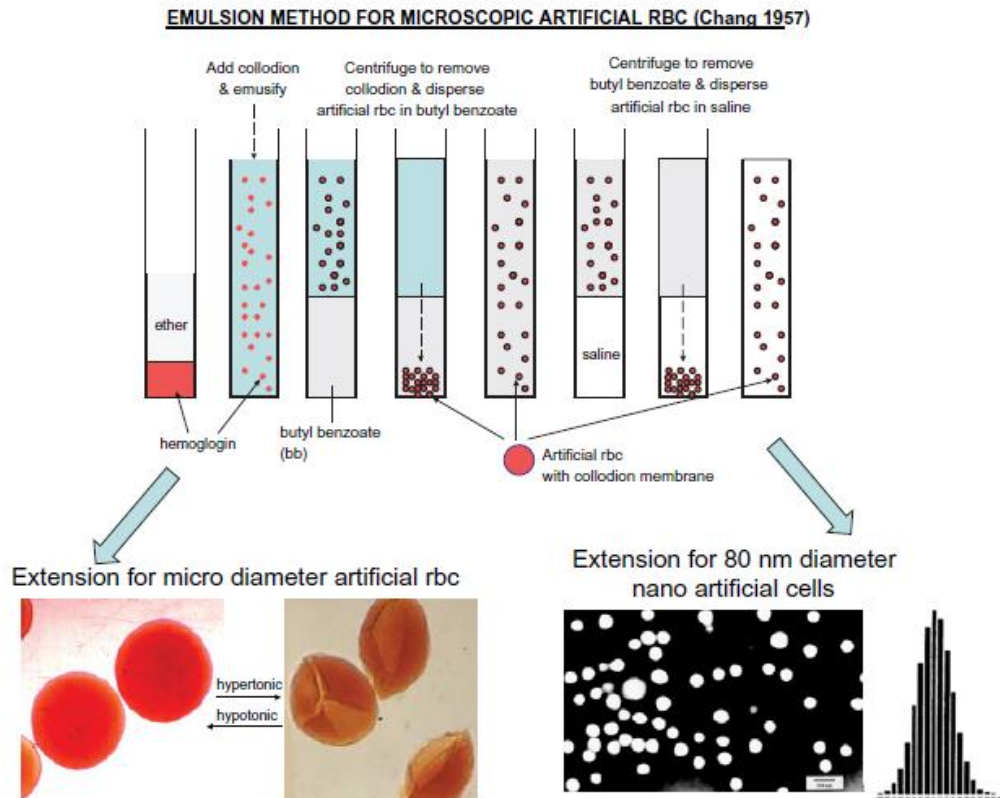


Figura 2.1.2. Viene raffigurato un metodo che utilizza l'emulsione per formare le membrane artificiali e mostra in basso il passaggio dalla dimensione del micro a quella del nano[10].

Variazione nel contenuto, le cellule artificiali possono contenere lo stesso materiale biologico delle cellule biologiche, inclusa emoglobina, tutti gli enzimi contenuti nelle cellule sanguigne, e tutto ciò che può essere considerato utilizzabile nell'ambito della nano medicina.

Lo spessore nanometrico delle membrane, prima di tutto la membrana permette di separare il contenuto della cellula dall'esterno, ma allo stesso tempo la membrana può essere selettivamente permeabile a determinate molecole. In questo modo si possono preparare le membrane artificiali la cui selettività è connessa alle dimensioni molecolari, alla solubilità lipidica, all'affinità delle proteine che costituiscono i carrier e altri meccanismi.

Le proprietà superficiali delle cellule artificiali possono essere variate attraverso l'incorporazione di cariche negative o positive; attraverso l'innesto di albumina che mi permette di aumentare la compatibilità sanguigna, proprietà molto importante perché le cellule a contatto con il sangue non devono essere viste come cellule estranee e non devono far scatenare nessun tipo di reazione se non voluta dal tipo di utilizzo che ne viene fatto; inserire antigeni per catturare anticorpi o viceversa;

incorporare polisaccaridi o polietilene glicolico (PEG) per aumentare il tempo di circolazione di queste cellule [8].

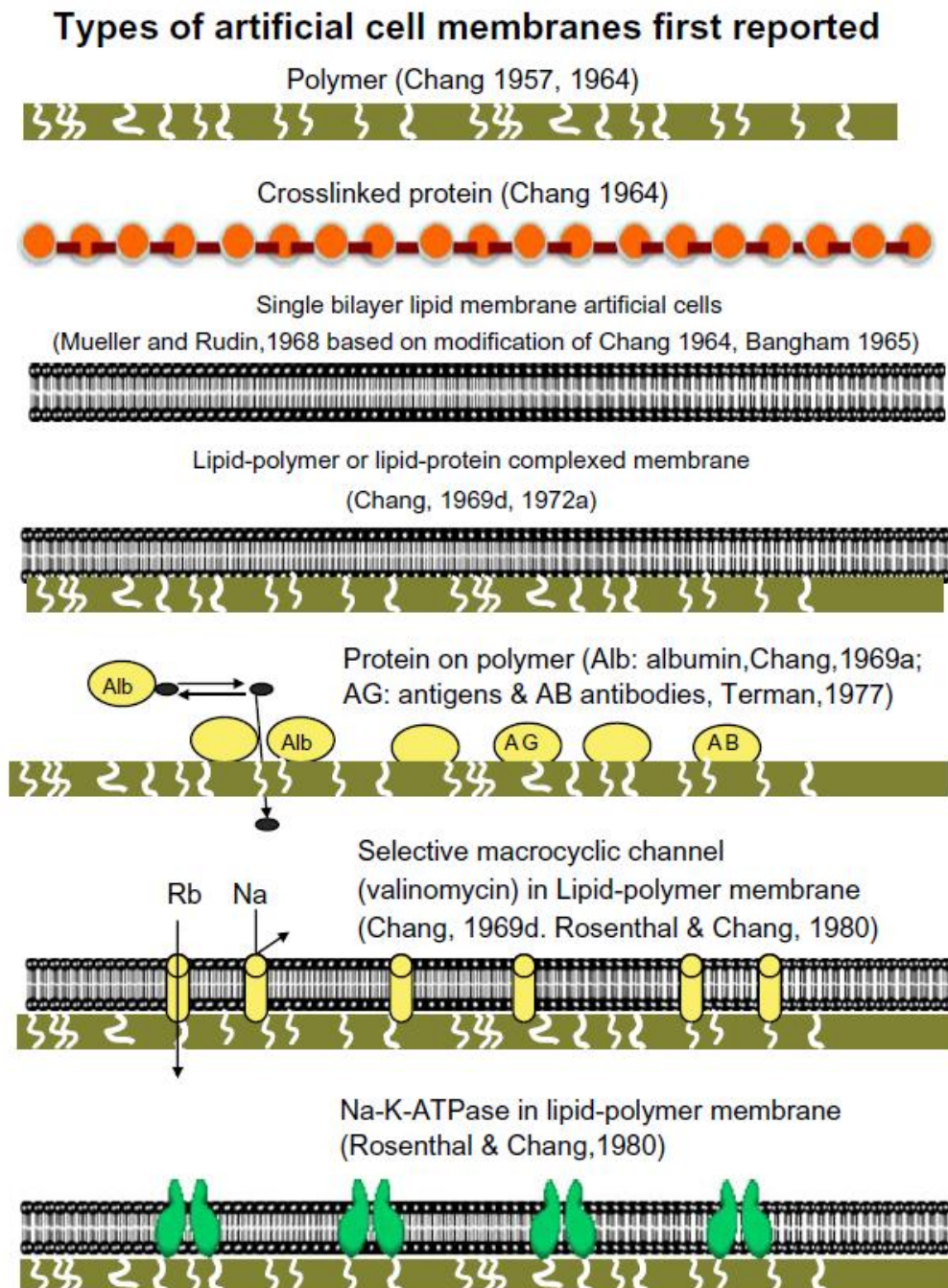


Figura 2.1.3. Si può notare lo sviluppo delle membrane nel corso del tempo attraverso l'aggiunta di canali e proteine di membrana in grado di renderle selettivamente permeabili a determinate sostanze [10].

3.1.3. Eritrociti artificiali di dimensione micrometrica con membrana sintetica ultrasottile

I primi eritrociti artificiali, di dimensione micrometrica e circondati da membrana sintetica ultrasottile erano composti da:

Membrana

Le membrane cellulari biologiche sono composte non solo da un doppio strato lipidico ma sono molto più complicate in quanto sono presenti determinate proteine nella membrana che svolgono un ruolo strutturale e funzionale per la cellula. Le membrane artificiali quindi sono delle strutture molto meno complesse di quelle biologiche, possono essere realizzate utilizzando differenti polimeri sintetici o materiali biologici. Una delle prime cellule artificiali possedeva una membrana ultrasottile composta da nitrocellulosa, polyamide, silastic, polystyrene oppure da un crosslink di proteine. A seconda del polimero utilizzato la membrana possiede determinate caratteristiche p.es se abbiamo una membrana composta da silastic essa sarà permeabile solo a gas come ossigeno, anidride carbonica e molecole lipofile. Un secondo esempio di membrana può essere quella costituita da nitrocellulosa e polyamide la quale possiede un diametro dei pori che varia tra 18-19 Å; questo non permette l'attraversamento delle grandi proteine ma permette il transito di peptidi e altre piccole molecole. Con queste considerazioni si possono preparare diversi tipi di membrane con vario diametro di porosità, o porosità nella nel caso del silastic [8].

Emoglobina

Il contenuto di un eritrocita, avvolto in butyl benzoate rivestito da una membrana artificiale in collodio, contiene una combinazione di emoglobina e metaemoglobina. L'ossiemoglobina mantiene la sua abilità di combinarsi in maniera reversibile con l'ossigeno. Inoltre se nel contenuto dell'eritrocita vi si aggiunge dell'altro enzima catalase vi è una riduzione marcata della formazione di metaemoglobina. In caso di preparazione di membrane artificiali di nylon si ha una formazione maggiore di metaemoglobina mentre l'utilizzo di silastic lascia inalterata l'emoglobina la quale può combinarsi reversibilmente con l'ossigeno.

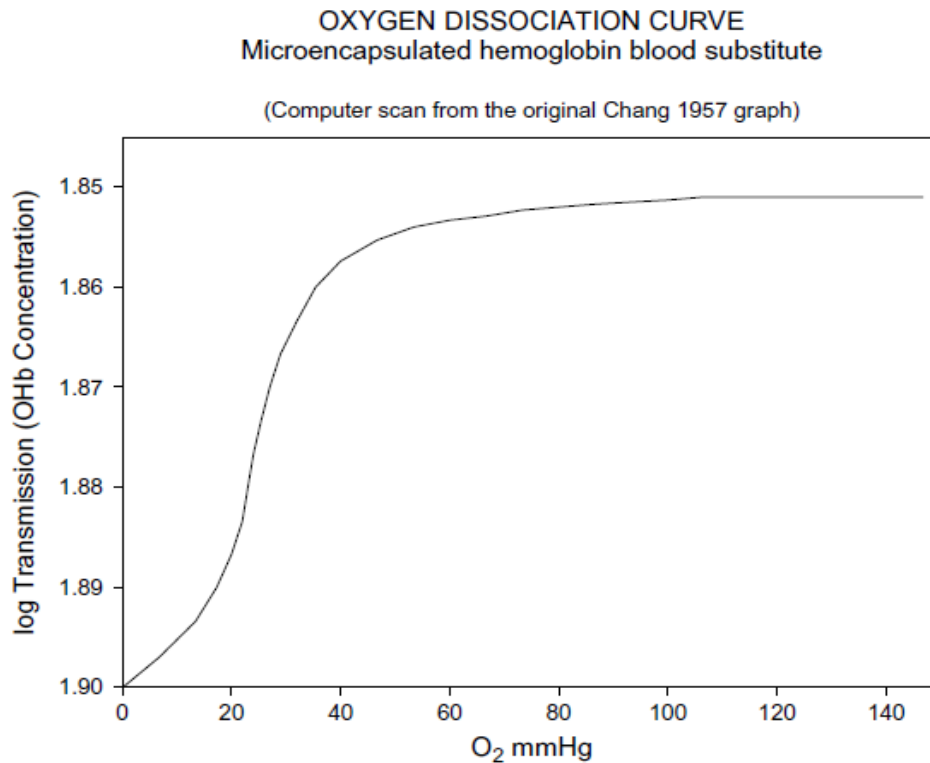


Figura 3.1.2. Curva di dissociazione dell'ossigeno di cellule con membrana artificiale [10].

Anidrasi carbonica

Questo enzima è contenuto in alte quantità negli eritrociti, opera un ruolo importante nel trasporto dell'anidride carbonica. Questo enzima è rinchiuso all'interno della membrana artificiale di collodio, nylon, o crosslink di proteine mantenendo in tutti questi casi la sua funzione.

L'attività dell'enzima CA è misurata in base alla caduta di pH quando la CO₂ è disciolta in una soluzione tampone. Un campione di soluzione salina tampone viene messa in contatto con gli eritrociti e le cellule artificiali per 24 h, questo contatto ha dimostrato che non vi è un'attività enzimatica, indicando così che l'enzima CA non è fuoriuscito dalla cellula durante questo periodo.

L'anidrasi carbonica nelle cellule artificiali possiede il 75% di attività rispetto all'eritrocita e questo risulta essere un livello accettabile per catalizzare l'anidride carbonica [8].

Catalasi

È un componente importante negli eritrociti. Questo enzima è coinvolto nella scomposizione dei radicali di ossigeno che si vengono a formare con il suo trasporto. Analizzando il comportamento delle cellule artificiali aventi membrana di collodio sia in vitro che in vivo le cellule artificiali mantengono a un livello accettabile questa funzione.

Caratteristica immunologica

Le cellule artificiali ottenute con i diversi polimeri non possiedono antigeni di membrana responsabili di problemi di compatibilità sanguigna tra individui con diversa tipologia di sangue.

Infusione intravenosa

Operando una infusione intravenosa di durata circa 1.5 min di una sospensione di cellule artificiali aventi diametro $5\mu\pm 2.5\mu$ con membrana di nylon e analizzando un campione estratto in questo lasso di tempo si possono fare le seguenti conclusioni.

Il livello di pressione arteriosa sale rapidamente durante l'infusione ma se la si rende discontinua la pressione cala rapidamente. Si nota anche che molte cellule compiono uno o più circolazioni prima di essere rimosse dal sangue. Esperimenti condotti usando membrana composta da Cr-labeled nylon mostra che la rimozione avviene attraverso i reni, polmoni e dalla bile. Utilizzando il collodio anzi che il nylon otteniamo lo stesso risultato e cioè una rapida rimozione dalla circolazione. Durante l'infusione si registra una caduta di pressione arteriosa e un aumento di quella venosa compatibile con un'embolia polmonare, questo significa che le cellule artificiali pur avendo dimensioni inferiori agli eritrociti non posseggono la capacità di deformarsi per raggiungere capillari con diametro inferiore [8].

Carica superficiale

Guardando attraverso un altro punto di vista gli eritrociti e i corpuscoli all'interno del sangue si può notare che essi posseggono una carica superficiale negativa dovuta alla presenza di una sostanza chiamata n-acetylneuraminic; più in particolare gli eritrociti meno datati hanno una carica maggiore del 30% rispetto quelli più vecchi presi sempre dallo stesso campione di sangue.

Rimuovendo l'acido neuraminico dagli eritrociti si può andare a valutare se la carica influisce sulla durata della circolazione del corpuscolo; in particolare sono stati testati i tempi di circolazione degli eritrociti in quattro cani, prima si è valutata la durata in circolo marchiando gli eritrociti con la sostanza Cr-labeled che mostra una durata di 4 mesi; poi prelevando gli eritrociti da ogni singolo cane, rimuovendo l'acido neuramico e procedendo alla reintroduzione in circolo si è notato immediatamente che sfociava in una rimozione molto rapida dalla circolazione, essi si dimezzavano in 2 h dall'iniezione. Si può concludere che la permanenza in circolo degli eritrociti può essere condotta dalla presenza di acido neuramico nella membrana. Considerando ora che le membrane delle cellule artificiali possono essere costituite da polimeri si sono condotti dei test sugli effetti sulla circolazione della carica superficiale, questi effetti vengono testati attraverso l'uso di un

semplice modello che comprende l'utilizzo di particelle di polimero con diametro di $2.05\mu \pm 0.018\mu$ diluite in una soluzione salina. Una simile sospensione viene preparata utilizzando polystyrene latex solfonato per 30 sec da Ag_2SO_4 e H_2SO_4 , successivamente lavata con soluzione salina. Con questo preparato si è notato che il livello di contenuto in circolazione si abbassa prima rapidamente e poi in maniera più lenta e che non veniva più rimosso dai polmoni ma solo dal reticolo endoteliale; mentre il primo preparato, cioè quello non solfonato viene catturato rapidamente ed in maniera efficiente dai polmoni e dal reticolo endoteliale. Da questo studio è emerso quindi che in termini di durata in circolazione conviene realizzare membrane solfonate di nylon le quali vengono realizzate con diamina solfonata come 4,4'-diamino-2,2'-diphenyldisulfonic acido [8]. Queste membrane di nylon solfonato possono avere diverse quantità di cariche negative superficiali preparandole con una differente dose di diamina solfonata in una soluzione alcalina e procedendo poi alla preparazione della membrana di nylon. Le membrane artificiali formate con nylon solfonato si mantengono per un tempo superiore in circolo rispetto a quelle realizzate con nylon, inoltre sono meno intercettabili dalla circolazione polmonare e dal reticolo endoteliale.

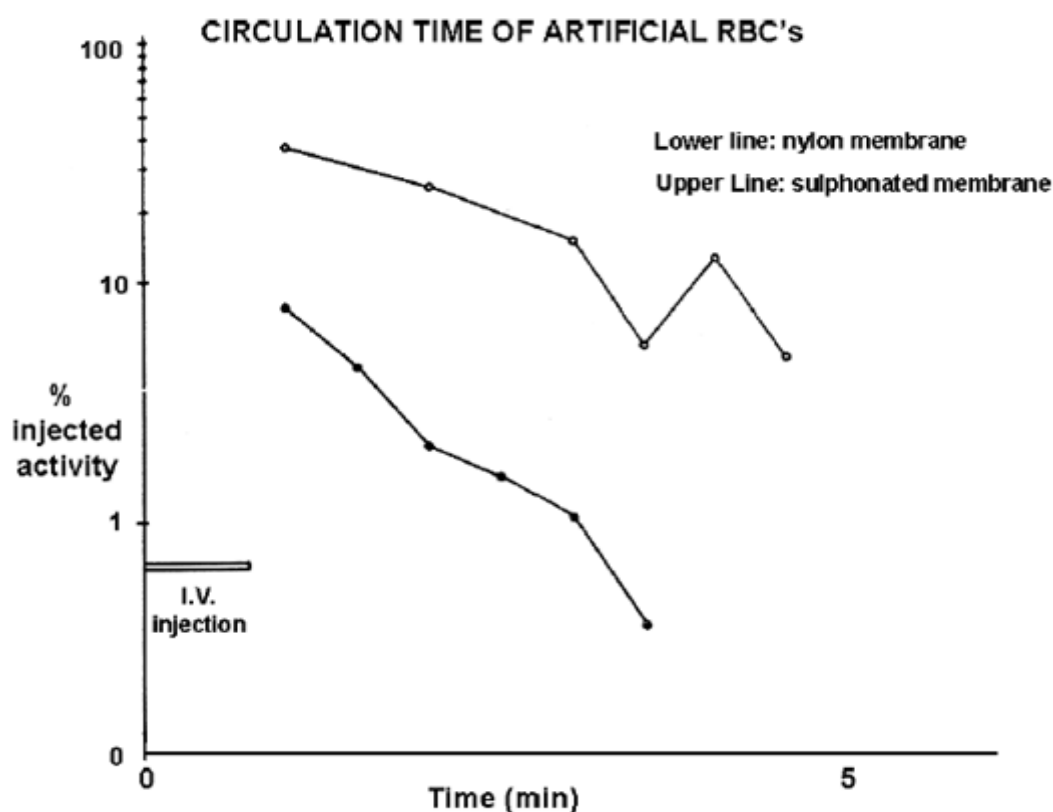


Figura 3.1.3. Tempo di circolazione di cellule artificiali infuse in un gatto [10].

Polisaccaridi

Siccome gli eritrociti e la parete interna dei vasi sanguigni sono ricoperti da mucopolisaccaridi si è considerato l'utilizzo di mucopolisaccaridi (p.es. eparina) all'interno delle membrane artificiali ottenute con collodio. I risultati preliminari hanno dimostrato che le nuove cellule artificiali al pari delle precedenti venivano eliminate rapidamente ma con l'aggiunta di eparina sopravvivevano in circolo per un tempo più significativo.

Uno dei principali problemi riscontrati delle cellule artificiali risulta essere la breve permanenza in circolazione e quindi la loro facile rimozione dal circolo sanguigno.

3.1.4. Membrane lipidiche di cellule artificiali inferiori al micron di diametro

Queste membrane sono formate da colesterolo e fosfolipidi. Uno degli obiettivi principali è quello di incapsulare l'emoglobina con il minor numero di lipidi possibili in modo da evitare un sovraccarico del sistema endoteliale.

Utilizzando vescicole lipidiche si possono ottenere cellule artificiali con diametro pari a 0.2 micron. L'uso dei lipidi ha aumentato il tempo di circolazione ma nonostante questo esso continua a essere molto breve.

Introducendo all'interno delle membrane lipidiche artificiali emoglobina si costituisce l'emoglobina lipidica incapsulata (LEH).

La sua composizione e preparazione risulta essere la seguente.

LEH consiste in membrane lipidiche di colesterolo e fosfolipidi. Il principale obiettivo a cui si mira è di migliorare l'efficienza dell'incapsulamento e quindi ridurre il numero di lipidi che costituiscono la membrana artificiale; questo può essere fatto includendo nella membrana lipidi anionici. Questa introduzione permette inoltre di migliorare il tempo di circolazione della cellula; è importante tenere in considerazione che lo stesso tipo di lipide prodotto da aziende differenti può interagire in modo diverso a livello dell'organismo, questo perché si possono ricavare con diversi procedimenti e utilizzando sostanze differenti e quindi è necessario effettuare uno screening per verificare come possono reagire con l'organismo [8].

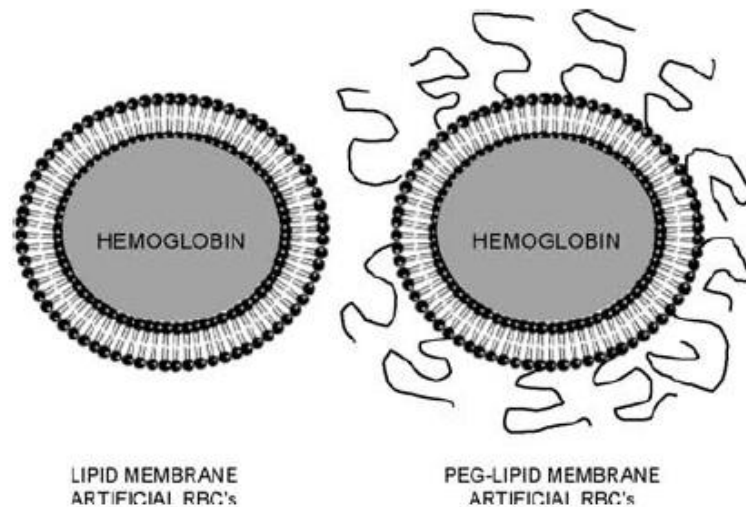


Figura 3.1.4. A sx emoglobina incapsulata in un doppio strato lipidico, a dx l'unione con il polimero PEG [10].

Utilizzando il *polietilene-glicolico* (PEG) unito a queste membrane lipidiche artificiali si registra un aumento ulteriore del tempo di circolazione di queste cellule in modo tale da essere utilizzate a livello di terapie cliniche.

La produzione di PEG-LEH viene effettuata con una pastorizzazione a 60°C per 10 h in modo da rendere inattivi i virus che potrebbero essere presenti. La conversione di Hb in carbominemoglobina (HbCO) aumenta la stabilità dell'emoglobina in fase di pastorizzazione; durante questa fase tutti gli enzimi e le proteine vengono denaturate e precipitate ottenendo in questo modo una soluzione di emoglobina pura. Questo processo però rimuove gli enzimi derivati dagli eritrociti in grado di contrastare la formazione di metaemoglobina. Per risolvere questo problema si cerca di co-incapsulare glutazione e catalasi nella soluzione di Hb; può essere modificata anche l'affinità con l'ossigeno attraverso l'introduzione di attuatori allosterici. Alla fine della pastorizzazione la soluzione viene filtrata per eliminare ogni tipo di virus. Infine si effettuano degli bilanciamenti elettrolitici e poi viene incapsulata nella membrana artificiali PEG-LEH. HbCO viene convertita in ossiemoglobina attraverso l'esposizione del LEH ad una particolare lampada. Utilizzando un numero progressivo di processi di estrusione si ottengono PEG-LEH con un diametro di 250 ± 20 nm con un rapporto di Hb/lipidi pari a 1.7-1.8.

L'Hb all'interno delle PEG-LEH non provoca pressione colloidale osmotica quindi deve essere aggiunto siero umano di albumina o dextran in sospensione nella soluzione per ottenere questo importante fattore.

Le membrane lipidiche contenenti PEG sono state studiate intensamente in modo da essere prodotte in larga scala per effettuare test preclinici.

I risultati di questi test hanno dimostrato che le funzionalità renali sono rispettate, la concentrazione dei grassi in circolo aumenta ma ritorna a livelli normali in due settimane, indicando quindi che i componenti della membrana lipidica vengono metabolizzati dal nostro organismo e cosa molto importante non hanno prodotto vasopressione.

L'ostacolo maggiore che separa la realizzazione pratica delle originali cellule sanguigne è il breve tempo di circolazione. Ci sono da considerare anche altri aspetti per quanto riguarda l'emoglobina incapsulata.

Prima di tutto essa può venire usata in varie terapie cliniche ma più piccole saranno le particelle, maggiore sarà l'area superficiale occupata e questo comporta un grosso aumento di lipidi in circolo che va ad influenzare l'attività del sistema endoteliale.

Un secondo problema è la formazione di metaemoglobina.

Metaemoglobina

Gli agenti riducenti e il glucosio non possono attraversare la membrana dell' LEH. Quindi gli agenti riducenti contenuti nel plasma non vi possono entrare per ridurre la formazione di metaemoglobina. Tutti gli enzimi degli eritrociti sono stati rimossi durante la procedura di pastorizzazione; se il sistema di riduzione della metaemoglobina venisse aggiunto esso avrebbe bisogno di glucosio per riciclare la metaemoglobina in emoglobina. Come risultato l'emoglobina in LEH è lentamente trasformata in metaemoglobina dopo l'infusione alla temperatura corporea di 37°C. L'aumento del tempo di circolazione risulta inutile se tutta l'emoglobina si trasforma in metaemoglobina durante il circolo. Per risolvere questo tipo di problema vengono aggiunti prima di incapsulare l'emoglobina nel LEH gli agenti antiossidanti come glutatone, omocisteina e catalasi in modo tale da rallentare la conversione di emoglobina in metaemoglobina [8, 20].

3.1.5. Membrane polimeriche artificiali biodegradabili

Queste cellule artificiali di dimensioni nanometriche e con membrane biodegradabili hanno risolto in parte il problema della breve circolazione all'interno del nostro corpo.

Nello sviluppo di questa tipologia di cellula gli obiettivi preposti sono quelli di :

1. Non contenere, oppure contenere in minor quantità lipidi.
2. Aumentare il tempo di circolazione.
3. Aumentare la stabilità di conservazione.
4. Stabilità a seguito di infusione in modo tale da assolvere alla sua funzione di cellula sanguigna ed essere metabolizzata dal sistema in quanto biodegradabile.
5. La sua membrana e i prodotti della sua metabolizzazione devono essere non tossici.
6. In aggiunta all'emoglobina queste cellule devono contenere enzimi importanti come CAT, SOD, CA e metaemoglobina riduttasi.
7. Le membrane devono essere permeabili per ridurre gli agenti tossici o ad esempio lasciare libero passaggio al glucosio.

Per avere una membrana biodegradabile viene utilizzato *l'acido polilattico* (PLA) ottenendo membrane di spessore nanometrico in grado di contenere enzimi e emoglobina, denominate membrane PLA-PEG [8,13].

Polimeri di questo tipo sono considerati biodegradabili perché il nostro corpo scompone l'acido polilattico in acido lattico il quale viene normalmente metabolizzato dal nostro organismo e trasformato in anidride carbonica e acqua.

Per modificare il tempo di degradazione basta variare il peso molecolare della struttura; per quanto riguarda la tossicità dei polimeri deriva dal fatto che durante la loro formazione vengono utilizzati additivi tossici i quali danno vita a dei monomeri dannosi per il nostro organismo. Per evitare residui tossici esse vengono preparate con un metodo di evaporizzazione di solventi.

Queste cellule artificiali di dimensione nanometrica sono state caratterizzate attraverso l'uso di un elettromicroscopio a 60 KV. Esse risultano sferiche e omogenee, il loro diametro si aggira all'incirca 40-120 nm, con un diametro medio di 80 nm; la sottigliezza della membrana risulta essere di 5-15 nm [8].

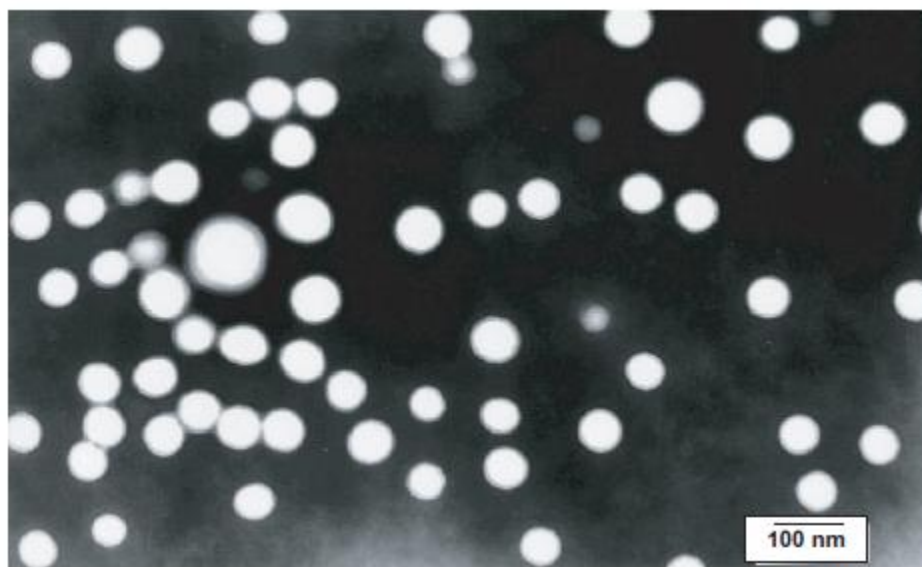


Figura 3.1.5. Visione in elettroscopio di cellule artificiali ottenute con acido polilattico, diametro medio di 80 nm [10].

Esse vengono ottenute con 10.97 gm/dl di emoglobina preparata con d,l-PLA. Le nanocapsule possono essere preparate con una concentrazione superiore a 15 gm/dl di emoglobina. Il materiale totale che compone la membrana è inferiore a quello delle LEH. Le membrane delle cellule artificiali nanometriche sono composte da polimero biodegradabile con una presenza minima di lipidi, siccome il polimero risulta essere forte e poroso come il lipide, essi si ritrovano in quantità maggiore nella struttura della membrana a discapito dei lipidi [8 ,11].

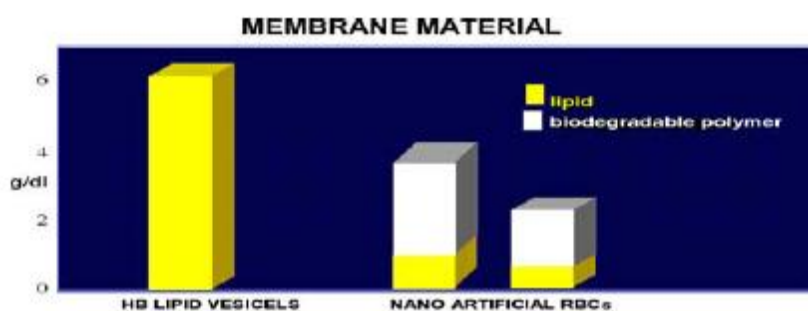


Figura 3.1.6. La colonna del grafico a sinistra segna la concentrazione dei lipidi in una vescicola lipidica, a destra si può notare dal grafico come la maggior parte dei lipidi sia sostituita dai polimeri biodegradabili [10].

3.1.6. Enzimi e multienzimi

Si è introdotto all'interno della cellula il sistema di riduzione della metaemoglobina in emoglobina; grazie al PLA si è prodotta una membrana in grado di essere permeabile al glucosio e altre piccole molecole; questo permette di preparare cellule artificiali nanometriche contenenti il sistema di riduzione della metaemoglobina. I prodotti della reazione possono diffondere all'esterno della cellula senza accumularsi al suo interno, inoltre gli agenti riducenti presenti all'esterno possono diffondere nella cellula aiutandola a prevenire la formazione di metaemoglobina [11].

Sistema di riduzione metHb

Per aumentare il tempo di circolazione della cellula artificiale sono state introdotte al suo interno molte funzioni che possiedono le cellule biologiche; purtroppo per colpa della temperatura corporea (37°C) avviene una rapida ossidazione dell'emoglobina in metaemoglobina all'interno della cellula artificiale, per risolvere questo problema si è introdotto il sistema enzimatico di riduzione della metaemoglobina (metHb).

Le cellule artificiali PLA possono contenere qualsivoglia tipo di enzima posseduto dalle cellule sanguigne biologiche e quindi vi si può inserire al loro interno anche questo sistema enzimatico.

Durante la preparazione delle cellule artificiali gli enzimi e l'emoglobina vengono estratti dalle cellule biologiche e inseriti all'interno di quella artificiale, questo provoca un aumento dei livelli di metaemoglobina all'interno della cellula. Introducendo glucosio (100mg/dl) e 0.02 mM dell'enzima NADH i livelli di metaemoglobina si abbassano con il passare del tempo [8, 11].

Questi risultati sono notevoli in quanto basta prelevare dalle cellule biologiche il loro contenuto e incapsularlo all'interno di quelle artificiali aggiungendo un determinato quantitativo di metHb per ottenere una cellula in grado di convertire la metaemoglobina in emoglobina senza però evitare la sua formazione.

Il cofattore NADH non è permeabile alla membrana delle cellule ma può essere incluso all'interno della cellula artificiale in questo modo non è richiesto fornirlo attraverso infusione.

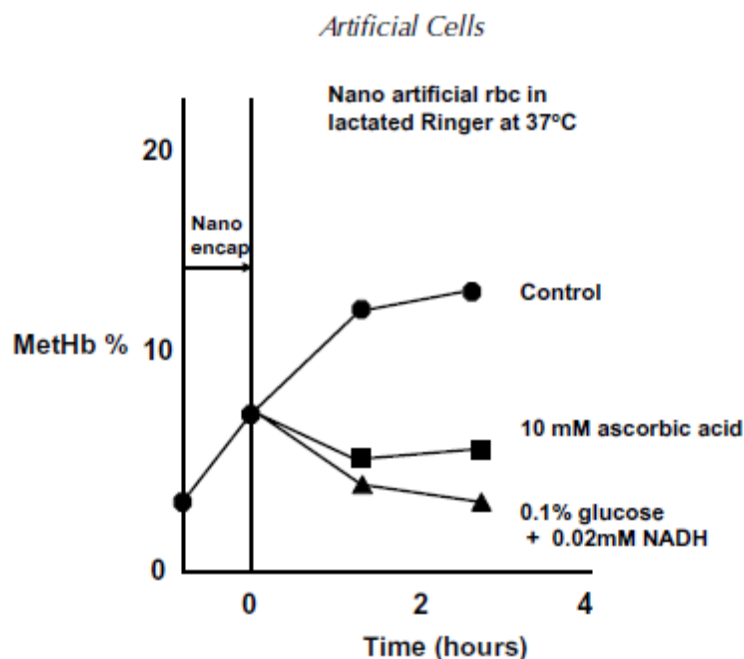


Figura 3.1.7. Aumento del livello di metHb dovuto all'incapsulamento. Incubata a 37°C si registra un aumento della metHb, con l'aggiunta di vitamina C questo aumento è scongiurato mentre con l'introduzione di NADH e glucosio si ritucono i livelli di metHb [10].

Importante inoltre è anche la *permeabilità ai fattori di riduzione*, questi fattori sono presenti nel plasma. Essi permettono di ostacolare la conversione di emoglobina in metHb e sono l'acido ascorbico (vitamina C) e il glutathione.

Questi possono attraversare la membrana artificiale e fungere da agenti riducenti impedendo l'ossidazione dell'emoglobina all'interno della cellula.

Metodo di preparazione

Fase organica: si dissolvono 100 mg di acido polilattico in 8 ml di acetone; si sciolgono 50 mg di hydrogenated soybean phosphatidylcholine in 4 ml di etanolo con l'aiuto di un bagno ultrasonico a bassa potenza. Si procede all'unione delle 2 soluzioni.

Fase acquosa: si prendono 0.04 ml di Tween 20 miscelato a 25 ml di emoglobina 15g/dl [8].

Preparazione di cellule artificiale PLA

Si inietta lentamente (8ml/min) utilizzando una pipetta da 0.2 ml. La fase organica è integrata a quella acquosa attraverso agitazione magnetica al di sotto di 4 °C. Le nano particelle si formano immediatamente e la sospensione continua ad essere agitata per 15 minuti. Il solvente organico è parzialmente rimosso dalla sospensione attraverso un evaporatore a 20°C per circa 10 minuti. La

sospensione rimanente è miscelata con 15 ml di 0.9% NaCl. A questo punto il solvente organico e l'emoglobina libera vengono rimossi attraverso ultrafiltrazione. La sospensione finale è lavata ripetutamente con 0.9% di NaCl e ultra filtrata [8].

Preparazione PEG-PLA

½ g di DL-PLA e 0.75 g di methoxypolyethylene glicol asciugati sotto un asciugatore. Si aggiungono 5 ml di acetone. La miscela è portata ad una temperatura di 180°C per 2 h. Dopo aver aggiunto 10 µl di stannous-2-ethylhexanoate, la miscela è riscaldata a 180 °C per altre 3 h. il composto è solubile in acetone ma non in acqua. Questa PEG-PLA è utilizzata per preparare le cellule artificiali di dimensione nanometrica. La procedura è simile a quella utilizzata per ottenere le cellule PLA ma con i seguenti accorgimenti. Si sciolgono 150 mg di copolimero PEG-PLA in 8 ml di acetone; si dissolvono 50 mg di hydrogenated soybean phosphatidylcholine in 4 ml di etanolo. Infine le due soluzioni si miscelano fino a formare una fase organica [8].

3.1.7. Applicazioni

I principi delle cellule artificiali sono stati utilizzati per ottenere la miniaturizzazione di dispositivi in grado di purificare il sangue.

Utilizzando le membrane ultrasottili e combinandole con i diametri nanometrici delle cellule artificiali si ottiene una relazione superficie-volume molto grande. In questo modo un piccolo volume di cellule artificiali possiedono un potenziale trasferimento di massa di gran lunga superiore a una macchina che non ne fa uso. Un aspetto da non sottovalutare è la capacità delle cellule artificiali di contenere materiali bioassorbenti o bioreattori in grado di avere un effetto migliore rispetto le vecchie macchine.

In particolare vengono utilizzate cellule artificiali con membrana polimerica ultrasottile contenenti carbone attivo, questa membrana non permette la fuoriuscita dalla cellula del carbone e in questo modo non si va in contro a danneggiamenti delle cellule sanguigne le quali attraverso contatto potrebbero danneggiarsi.

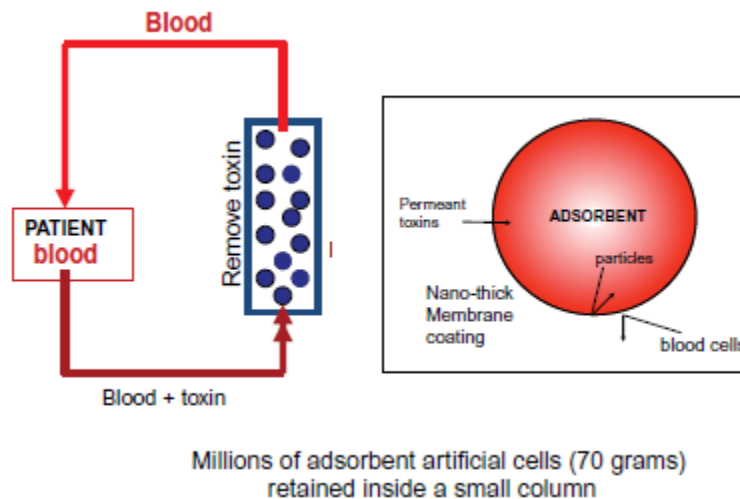


Figura 3.1.8. A sinistra l'immagine rappresenta uno schema circuitale del sangue che viene prelevato dal paziente, purificato e re-infuso nel paziente; a destra viene raffigurata la cellula artificiale permeabile agli agenti tossici ma non alle cellule sanguigne [10].

Cambiando il contenuto di queste cellule possiamo avere differenti funzionalità ed è questa la chiave del successo per questa tecnologia in via di sviluppo oramai da 50 anni.

oltre agli usi descritti nel capitolo precedente occorre accennare anche il caso di utilizzo di *Membrane artificiali per incapsulamento di cellule biologiche* in quanto hanno ed avranno un notevole impatto nel mondo della medicina e degli impianti in futuro [18].

Sono stati compiuti diversi tentativi con l'utilizzo delle membrane per prevenire il rigetto degli impianti a causa del nostro sistema immunitario.

Il problema principale è quello della scarsa autosufficienza delle cellule dovuta al fatto che non vi è un apporto sufficiente di ossigeno e nutrienti che attraversano la membrana.

Chang nel 1964 fu il primo ad incapsulare una cellula attraverso l'utilizzo di un metodo a caduta.

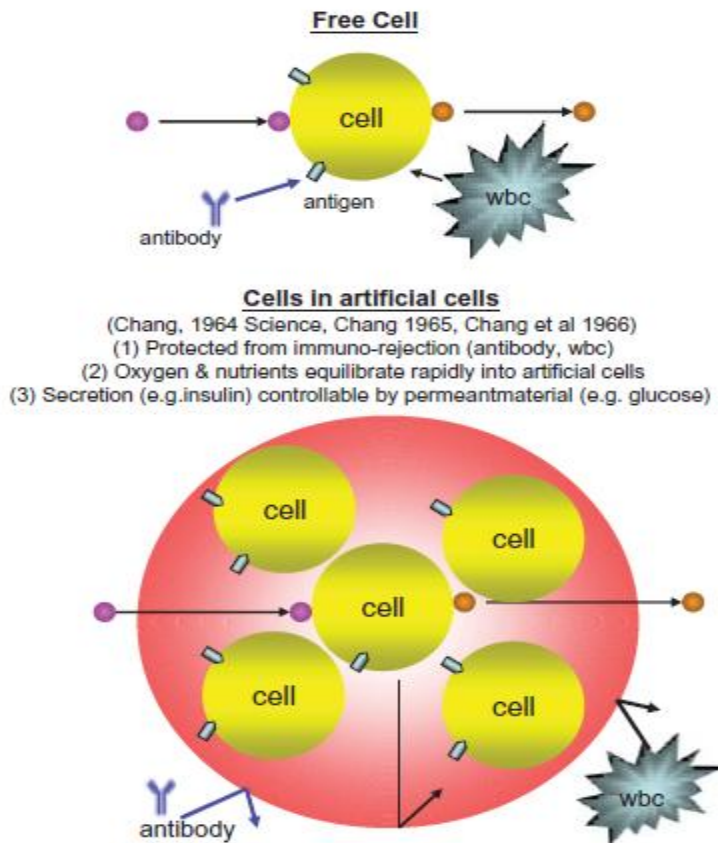


Figura 3.1.9. In alto una cellula biologica che interagisce con gli antigeni e scambia sostanze, subito sotto una cellula artificiale contenente altre cellule e si può notare che queste membrane artificiali non possiedono antigeni di membrana e quindi non vanno incontro a rigetto [10].

Grazie alla membrana si rende immune la cellula a rigetto, inoltre si garantisce anche un buon trasferimento di ossigeno e nutrienti per essa.

Per l'incapsulamento di cellule all'interno di cellule artificiali viene utilizzata una soluzione di emoglobina contenente cellule aggiunta a silicone liquido contenente acido dicarbossilico, sebacylchloride. L'acido dicarbossilico effettua il crosslink dell'emoglobina solo all'interfaccia per formare una membrana attraverso una polimerizzazione interfacciale e incapsulare quindi le cellule senza compromettere il loro contenuto e la loro struttura [8].

Il bioincapsulamento attraverso l'utilizzo di cellule artificiali ha vaste aree di ricerca, è possibile realizzare cellule che contengono altre cellule di tipo biologico come quelle del pancreas, del fegato, oppure batteri, cellule endocrine, cellule geneticamente modificate sfruttando così i loro meccanismi per consentire la sopravvivenza del nostro organismo privo di queste funzionalità.

I principali limiti per queste applicazioni riguardano la reperibilità di queste cellule biologiche, sono in atto studi riguardanti la possibilità di prelevare cellule di questo tipo da animali come i suini o

bovini; inoltre vi sono anche i limiti derivanti dalla scarsa permanenza di queste cellule all'interno del nostro organismo e quindi tutti i limiti derivati dalle cellule artificiali.

Cellule artificiali contenenti isole di Langerhans

Vengono realizzate attraverso l'incapsulamento delle cellule che svolgono una funzione endocrina nel pancreas chiamate isole di Langerhans. Viene sfruttata la capacità di regolare il glucosio nel sangue di queste cellule per contrastare il diabete inserendole all'interno delle cellule artificiali e permettendo in questo modo il trapianto evitando la possibilità di rigetto [2, 8].

Cellule artificiali contenenti epatociti

Questa tipologia di cellula artificiale è stata utilizzata come modello per terapie cellulari e genetiche. L'impianto di cellule artificiali contenenti epatociti innalza la possibilità di sopravvivenza dei ratti colpiti da una disfunzione epatica fulminea. Le cellule artificiali contenenti epatociti di ratto dopo l'impianto sulla cavia non hanno presentato rigetto; una particolare sindrome Crigler-Najjar provoca una defezione dell'enzima UDP-glucuronosyltransferase (UDPGT) provocando un aumento dei livelli di bilirubina. L'impianto di cellule artificiali contenenti epatociti ha portato a una riduzione del livello di bilirubina nel sangue e quindi a una risposta positiva del modello utilizzato, questo poiché l'UDPGT contenuto negli epatociti all'interno delle cellule artificiali porta a convertire la bilirubina in bilirubina coniugata che può essere espulsa attraverso l'urina. L'utilizzo principale di queste cellule è quello di andare a creare una sorta di "ponte" in grado di aiutare la rigenerazione del fegato dei pazienti e portare a termine la sua funzione [8].

Altre aree

Si microincapsulano cellule che producono eritropoietina per trattare forme di anemia e cellule derivanti dalla tiroide in grado di secernere ormoni in modo tale da regolare squilibri di tiroide.

Cellule sporgenti e intrappolate in membrane cellulari artificiali

Migliorare la riproducibilità, biocompatibilità e deformabilità delle membrane non risulta essere abbastanza. Le membrane artificiali standard di alginato-polylysine-alginato contenenti cellule sono ottenute come segue.

L'alginato è un polimero di un acido carbossilico accoppiato a catene glicosidiche di β -D-mannosio [8]. Il prodotto alcalino e il magnesio alginato sono solubili in acqua mentre l'acido alginico e i sali derivanti dai cationi metallici risultano insolubili. Quando si inserisce una soluzione di sodio alginato contenente cellule in sospensione in una contenente cloruro di calcio si ottiene una

sfera di gel. Le cellule sono disperse in ordine casuale all'interno della sfera di gel, vicino e lontano dalla superficie. Quando viene aggiunta polilisina, essa effettua fisicamente un crosslink dell'alginato sulla superficie per formare la membrana di polilisina-alginato; durante questo processo le cellule che si trovano vicino alla superficie possono sporgere dalla membrana che si è formata e utilizzando questo metodo per contenere un alto numero di cellule alcune di esse possono essere esposte o intrappolate nella membrana provocando effetti indesiderati come l'indebolimento della membrana, che riduce la sua emivita dopo l'impianto rilasciando il contenuto all'esterno, oppure reazioni immunologiche se le cellule si trovano sulla superficie della membrana.

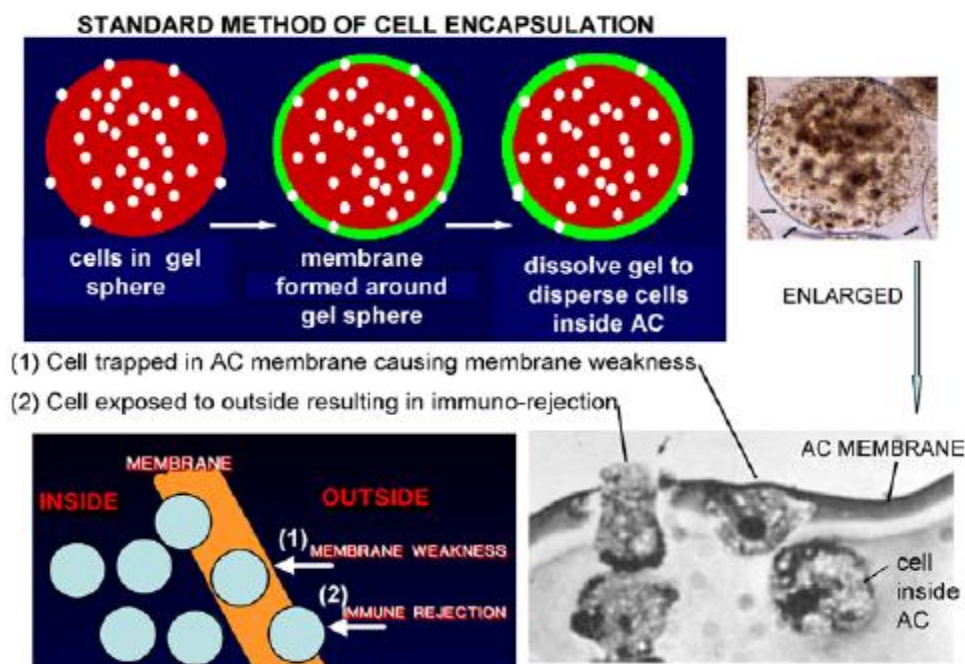


Figura 3.2.1. Metodo di incapsulamento di cellule attraverso l'uso di membrane ottenute da gel. Si può notare come le cellule possono rimanere intrappolate nella membrana e andare in contatto poi con l'ambiente extracellulare [10].

Perfezionamento del metodo

Per incapsulare un alto numero di piccole cellule si può utilizzare un metodo composto da 2 steps il quale risulta essere particolarmente efficiente nell'incapsulamento di epatociti geneticamente modificati. In breve, si crea prima una sottile membrana artificiale di gel come precedentemente descritto, contenente le cellule. Si procede poi a includere queste sottili sfere di gel in una sfera più grande in grado di contenerle; in questo modo non si avranno cellule in contatto con l'esterno e nemmeno cellule intrappolate nella membrana che ne risulta indebolita. Le membrane delle sferette

vengono poi dissolte all'interno della sfera di grande dimensione in modo tale da renderle libere all'interno [8].

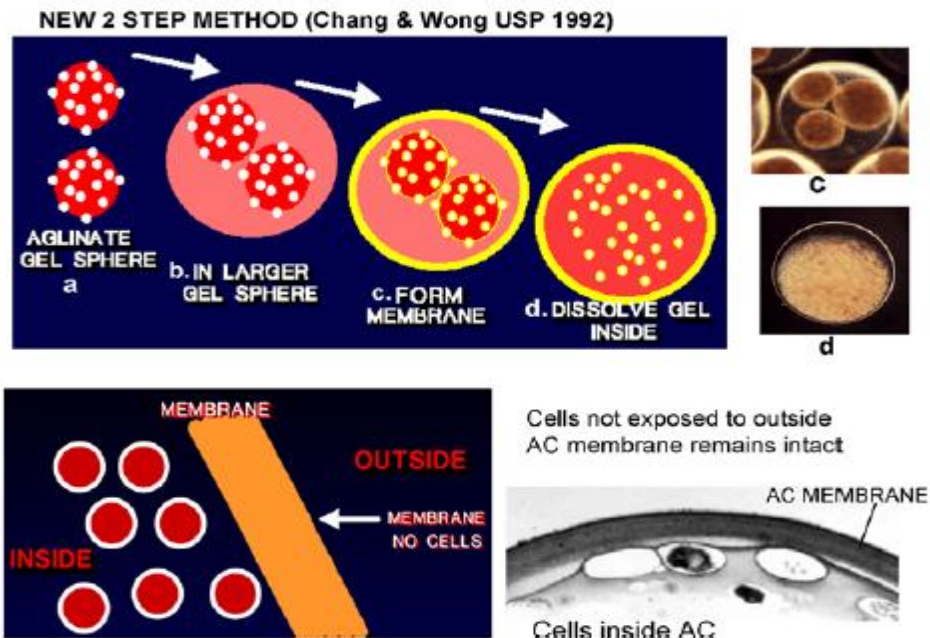


Figura 3.2.2. Ottimizzazione del primo metodo di incapsulamento di cellule, dove viene evidenziato come incapsulando le cellule già contenute in sfere più piccole si elimina il problema della presenza di cellule nella membrana [10].

Incapsulamento di cellule con fibre capillari

L'obiettivo da perseguire è quello di allungare i tempi di permanenza dell'impianto di cellule artificiali all'interno dell'organismo; utilizzando fibre capillari per incapsulare le cellule è stato possibile inserirle in modo sottocutaneo nel fluido cerebro spinale per un periodo di tempo breve, rimuovendole e rigenerandole, permettendo così di risolvere i problemi di conservazione per lungo termine di cellule ingegnerizzate geneticamente e altri problemi relativi al lungo periodo di impianto. Questo processo non è applicabile nei casi in cui sia richiesto un grande numero di cellule artificiali come nel caso di epatociti o isolette [8].

Cellule artificiali contenenti cellule geneticamente modificate

Le cellule possono essere geneticamente modificate fuori dal corpo per ottenere una miglior specializzazione e una più specifica funzione. Purtroppo utilizzando cellule provenienti da un singolo individuo (cellule autologhe) si renderebbe troppo individualizzato il procedimento e non risulta essere possibile la produzione su larga scala; utilizzando cellule provenienti da più persone

(cellule allogeniche) è possibile una produzione su ampia scala ma con l'utilizzo di sostanze in grado di sopprimere la repulsione immunologica. Queste cellule risultano essere immunoisolate ma l'ossigeno e i nutrienti possono entrarvi e gli agenti terapeutici possono fuoriuscirvi per ottenere una determinata funzione all'interno del nostro corpo. Vengono utilizzate per condizioni in cui è richiesto l'ormone della crescita, anticorpi monoclonali, eritropoietina, fattore XI, disordini neurologici e tumori. Cellule artificiali incapsulano i fibroblasti derivanti da topi, uniti ai geni umani dell'ormone della crescita (hGH) per produrre e fornire hGH quando impiantati in modelli di animali colpiti da nanismo; oppure incapsulano mioblasti geneticamente modificati in grado di secernere il fattore XI in grado di contrastare l'emofilia B. I disordini neurologici sono una potenziale area di applicazioni terapeutiche di cellule polimeriche artificiali, p.es le cellule artificiali possono incapsulare le neuro2A cellule contenenti il gene della propriomelanocortina in grado di rilasciare endorfina, che quando iniettata nel fluido cerebrospinale di ratti provoca una diminuzione della sensazione di dolore [8]. Una estensione dei principi delle cellule polimeriche artificiali coinvolge la preparazione di cellule polimeriche contenenti nella membrana fibre invece che una membrana polimerica sferica, un esempio di applicazione di questo metodo riguarda l'uso delle cellule artificiali contenenti cellule del rene di un criceto appena nato unite al gene, umano o di topo, che riguarda la produzione del fattore neurotrofico ciliare (CNTF) per il trattamento di malattie neurodegenerative come la sclerosi amiotrofica laterale. Vi è anche un grosso interesse nel potenziale uso di cellule artificiali contenenti cellule geneticamente modificate per la cura dei tumori. Sono state studiate cellule artificiali contenenti enzimi geneticamente modificati (cytochrome P540) per la cura di carcinomi pancreatici inoperabili; l'utilizzo di queste cellule artificiali permette di avere una concentrazione localizzata nella zona di interesse, in questo modo si va a minimizzare la tossicità sistemica e ad aumentare efficacia locale.

Cellule artificiali contenenti microorganismi

Microorganismi non patogeni e geneticamente modificati possono essere introdotti all'interno di cellule artificiali. Per esempio, lo *Pseudomonas pictorum* è in grado di rimuovere colesterolo. Sono stati condotti studi anche su cellule artificiali in grado di rimuovere l'urea attraverso l'utilizzo di batteri *E. colie* e *Klebsiella aerogenes* aumentando la capacità di rimozione dell'urea [8].

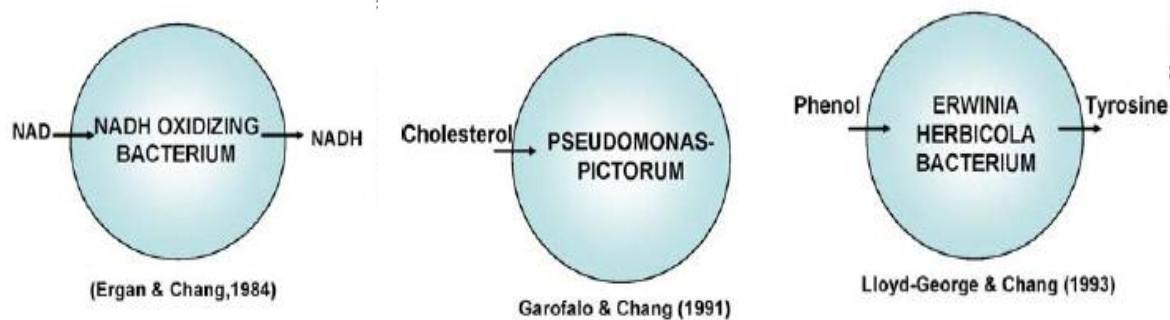


Figura 3.2.3. Rappresentazione di cellule artificiali contenenti batteri in grado di convertire sostanze o diminuire il livello di colesterolo [10].

Commenti conclusivi

La produzione su larga scala di sostituti ematici cellulari artificiali rimane un aspetto non risolto. La ricerca di soluzioni sicure, in termini di membrane biocompatibili, riproducibilità e durevolezza del prodotto, impiego di cellule geneticamente modificate procede tuttavia con risultati sempre migliori[19]. Le sinergie tra settori che vanno dalla chimica dei polimeri alla biologia molecolare e alle biotecnologie ne promuoveranno lo sviluppo in tempi ragionevoli.

Bibliografia

- [1] C. Rizzoli – M.A. Brunelli – C. Castaldini, (2004), “*Guida illustrata all’istologia*”, Piccin editore.
- [2] Dee U.Silverthorn – M. Passatore – S. Roatta – F. Vellea Sacchi , (2010), “ *Fisiologia umana. Un approccio integrato* ” , Pearson editore.
- [3] https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=eritrociti&lang=5
- [4] <http://www.chimicamo.org/chimica-generale/1%E2%80%99osmosi.html>
- [5] www.treccani.it/antigene
- [6] <http://ehl2000.com/index.php/2008/07/esistono-altri-gruppi-sanguigni/>
- [7] <http://www.my-personaltrainer.it/fisiologia/emoglobina.html>
- [8] Thomas Ming-Swi Chang (2003), “ *Artificial Cells, Biotechnology, nanomedicine, regenerative medicine, blood substitutes, bioencapsulation and cell/stem cell therapy*”, editore World Scientific.
- [9] Wikipedia, (2014), “ *Crosslink* ”
- [10] Chang (2007), “*monograph on Artificial Cells*”
- [11] Thomas Ming Swi Chang, <http://www.artcell.mcgill.ca> , “*Artificial Cells: the beginning of nanomedicine*”
- [12] <http://www.biotechnologyforums.com/thread-2328.html>
- [13] Thomas Ming Swi Chang (2006), “ *Blood substitutes based on nanobiotechnology*”, Published in trends in biotechnology
- [14] Wikipedia, (2014), “*Dismutazione*”
- [15] Thomas Ming Swi Chang (2009), “ *Nanobiotechnology for hemoglobin based blood substitutes* ” , stampato da Critical Care Clinics
- [16] Thomas Ming Swi Chang (2005), “*Therapeutic applications of polymeric artificial cells*”, Nature
- [17] <http://www.artcell.mcgill.ca> , “*Artificial cell: what is it and why do we need it*”
- [18] Thomas Ming Swi Chang (2012), “*From artificial red blood cells, oxygen carriers, oxygen therapeutics to artificial cells and nanomedicine and beyond*”, pubblicato in Artificial cells, blood substitutes and biotechnology
- [19] Thomas Ming Swi Chang (2009), “Blood substitutes in 2010”, <http://www.artcell.mcgill.ca>
- [20] Wikipedia (2014), “*Metaemoglobina*”